BAND 40, HEFT 3 JANUAR 1961

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras / Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

*herausgegeben von den Professoren*

**E. Gäumann** Zürich

**M. Klinkowski** Aschersleben

**H. Richter** Berlin-Dahlem

Mit 21 Abbildungen

1961

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

*Phytopath. Z. Bd. 40* Heft 3 *S. 221—316 Berlin 1961*

*Postverlagsort Berlin*

NSP RAM MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL 7 FEB 1961

# INHALT

**Abhandlungen**


SIEBERT, R., Biochemische Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis am Beispiel von *Puccinia graminis tritici*. Mit 3 Abb. ..... 221

SWAMY, R. N., Gaseous emanation from groundnut infected by *Cercospora personata* (Berk et Curt.) Ell. et Everh. With one figure ..... 245

FLÜCK, V., Über ein Infektionsverfahren mit *Mycena citricolor*. Mit einer Abb. .... 248

SCHÜEPP, H., Untersuchungen über *Guignardia citricarpa* Kiely, den Erreger der Schwarzfleckenkrankheit auf *Citrus*. Mit 7 Abb. ..... 258

OERTEL, C., Die Verwendung eines Serums gegen normale Pflanzeneiweiße für die Gewinnung eines hochwertigen Antigens. Mit einer Abb. ..... 272

AGNIHOTHRUDU, V., Notes on fungi from North-east India. VII—*Tunstallia* gen. nov. causing the "Thorny Stem Blight" of tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze). With 5 figures ..... 277

NAEF-ROTH, ST., E. GÄUMANN und P. ALBERSHEIM, Zur Bildung eines mazerierenden Fermentes durch *Dothidea ribesia* Fr. Mit 2 Abb. ..... 283

KERN, H., Physiologische und systematische Untersuchungen in der Gattung *Leucostoma*. Mit einer Abb. ..... 303

**Besprechung** ..... 315


---


*Manuskripte:* In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

*Herausgeber:* Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

*Honorierung:* Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

*Sonderdrucke:* Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.



*Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung:* Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photokopiergebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/M., Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.



*Erscheinungsweise:* Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jedes Heft enthält etwa 7 Druckbogen.

*Bezugsbedingungen:* Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

*Verlag:* Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).


---

**Abonnementspreis dieses Heftes 26,80 DM** **Einzelpreis 29,50 DM**

*Aus dem Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz*
*der Georg-August-Universität Göttingen*
*Direktor: Prof. Dr. W. H. Fuchs*

# Biochemische Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis am Beispiel von *Puccinia graminis tritici*[1])

Von

RENATE SIEBERT geb. BAUERMEISTER

*Mit 3 Abbildungen*

Die vorliegenden Untersuchungen gehören einem Themenkreis an, der sich schon in den Arbeiten von ROHRINGER (1957) und HEITEFUSS (1957) abzeichnet und liefern — darauf aufbauend — weitere Beiträge zu dem Wechselspiel zwischen Wirt und Parasit. Das angestrebte Ziel im Rahmen dieser Untersuchungen läßt sich folgendermaßen definieren: „an ausgewählten, möglichst genau definierten Wirt-Parasit-Paaren, die diesen eigene Zuordnung verschiedener Reaktionen aufzudecken und die Schlüsselbeziehungen zu finden, die das Zusammenspiel der Partner nach dem ‚Prinzip konkurrierender Reaktionen' entscheidend steuern" (FUCHS 1956).

Der hohe Grad der Spezialisierung der Rostpilze und die auch bei Weizenschwarzrost relativ lange „eusymbiontische Phase" lassen ein sehr fein abgestimmtes Wechselspiel der Symbiosepartner erkennen. Die vergleichsweise milde Einwirkung des Pilzes auf die Wirtspflanze (RUBIN und ARZICHOWSKAJA 1953) und der hohe Grad von Verträglichkeit der Partner machen dieses Modell geeignet für Untersuchungen über die stoffwechselphysiologische Verknüpfung beider Organismen in der ersten Phase des Zusammenlebens. In diesem Stadium, in dem noch keine sichtbaren Schädigungen eintreten, setzen wohl auch noch keine — die ursächlichen, spezifischen Wechselwirkungen störende — Abbauvorgänge ein, wohingegen „die letzte, aber augenfälligste Phase des pathologischen Stoffwechsels weniger spezifisch sein dürfte" (FUCHS 1956, vgl. auch RUBIN und ARZICHOWSKAJA 1953).

Die Untersuchung muß auf eine Gegenüberstellung gesunder und infizierter Pflanzen beschränkt werden, d. h. die physiologischen Leistungen des einen Partners, des Wirtes, können nur mit denen der neu entstandenen

[1]) D 7. Kurzfassung der gleichnamigen Dissertation, deren experimenteller Teil im Frühjahr 1959 abgeschlossen wurde.

funktionellen Einheit aus Wirt und Parasit verglichen werden. Diese beruht auf vielfältigen stoffwechselphysiologischen Verknüpfungen und komplizierten Wechselwirkungen beider Organismen. Die Meinung, „eine einzige wahre Ursache der Widerstandsfähigkeit auffinden zu müssen, während in der Natur ein Zusammenwirken vieler Prozesse vorliegt", wird schon von ROEMER, FUCHS und ISENBECK (1938) abgelehnt. GÄUMANN (1951) spricht von einer wechselweisen Aktion und Reaktion zwischen Wirt und Parasit, derzufolge nicht nur der Wirt im Verlauf der Erkrankung dauernd ein anderer als vorher ist und besonders ein anderer als vor der Erkrankung, sondern auch der Pilz; „Die ‚Krankheitsursache' ändert sich dauernd im Laufe der Erkrankung". In Fortführung solcher Gedankengänge stehen die Befunde von SEMPIO (1950), FARKAS (1957) und SHAW und HAWKINS (1958).

## I. MATERIAL UND METHODIK

### 1. Infektionsmaterial, Aufzucht und Inokulation der Versuchspflanzen

Die meisten Untersuchungen wurden mit dem Sommerweizen „Marquis", einige mit der Sorte „Vernal" durchgeführt; „Marquis" reagierte auf die verwendeten physiologischen Rassen von *Puccinia graminis tritici* 32 bzw. 21 (STAKMAN und Mitarb. 1944) mit dem Befallstyp „4=", „Vernal" mit „1=".

Die Keimpflanzen wurden in Töpfen im Thermostaten (26 bis 27 °C) bei natürlichem Licht herangezogen und auch nach der Infektion unter diesen Bedingungen gehalten. Während der Wintermonate wurde mit Quecksilber-Hochdrucklampen (HRL 250 W und HRL 400 W der Radium Elektrizitäts-Gesellschaft mbH., Wipperfürth, kombiniert mit den Radalreflektoren und den dazugehörigen Domen der Firma Ernst Rademacher GmbH., Düsseldorf) zusätzlich beleuchtet (etwa 6000 bis 8000 Lux in Pflanzenhöhe). Sonderversuche zur Belichtungsfrage wurden bei ausschließlich künstlicher Beleuchtung in einem Kellerraum durchgeführt, dessen Temperatur während der Versuchszeit tagsüber bei 25 bis 26 °C, nachts bei etwa 15 °C lag; die unterschiedliche Belichtung der Pflanzen wurde durch entsprechenden Abstand von der Lichtquelle erreicht.

Beimpft wurden Primärblätter von etwa 12 cm Länge (etwa acht Tage nach der Aussaat) durch Auftragen trockener Uredosporen auf die Blattunterseite; anschließend standen die Pflanzen 24 Stunden in einer Feuchtkammer. Der Infektionserfolg war gut und gleichmäßig.

### 2. Applikation der zu prüfenden Stoffe

In Anlehnung an die Technik von HEITEFUSS (1957) wurden die entsprechenden Lösungen durch Vakuuminfiltration in die abgeschnittenen Blätter eingeführt. Die Blätter wurden dann mit der Basis in Glasröhrchen mit Wasser oder Testlösung eingestellt und die Flüssigkeit jeden zweiten Tag erneuert.

Geprüft wurden Thiosemicarbazid (TSC), Semicarbazid (SC) und Fluoressigsäure (FES) in $2 \times 10^{-3}$ mol wässeriger Lösung bei pH 4,5. Die Konzentrationen waren in Vorversuchen als Grenzkonzentration für das Weizenblatt unter unseren Bedingungen ermittelt worden; sie liegen erheblich niedriger als die entsprechenden Grenzkonzentrationen für Kohl (TSC $10^{-1}$ mol, SC $10^{-2}$ mol); allerdings arbeitete HEITEFUSS (1957) bei höherer Luftfeuchtigkeit. Da nach unveröffentlichten Versuchen Aufnahme und Wirkung der genannten Hemmstoffe von der Transpirationsgröße abhängen, ist die Annahme berechtigt, daß die Differenz der Grenzkonzentration zum Teil aus den Versuchsbedingungen erklärt werden kann. Da aber bei Weizen die Werte für TSC und SC etwa gleich liegen, bei Kohl dagegen TSC besser „vertragen" wird als SC, dürfte auch ein Unterschied der Stoffwechsellage beider Objekte vorliegen.

*Tabelle 1*

Relative Konzentration der freien Aminoverbindungen in Extrakten der anfälligen Sorte „Marquis"

| | Tage nach der Infektion | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | | 5 | | 7 | | 9 | |
| | n | i | n | i | n | i | n | i |
| α-Alanin | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× |
| γ-Aminobuttersäure | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× | × | ×× | × |
| Asparagin | ×××× | ××××× | ×××(×) | ××××(×) | ××× | ×××× | ××× | ×××× |
| Asparaginsäure | ××(×) | ××(×) | ××(×) | ××(×) | ××(×) | ××(×) | ××(×) | ××(×) |
| Cystin | × | × | × | × | (×) | (×) | (×) | (×) |
| Glutamin | ××× | ××× | ××× | ××× | ××× | ××××(×) | ××× | ××××(×) |
| Glutaminsäure | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× | ×××× |
| Glycin | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× |
| Histidin/Arginin | ×× | ××× | ×× | ××× | ×× | ××× | ×× | ××× |
| Leucin/Isoleucin | ×× | ××× | ×× | ××× | ×× | ××× | ×× | ××× |
| Lysin | ×× | ××× | ×× | ××× | ×× | ××× | × | ×× |
| Phenylalanin | — | × | — | ×× | — | ×× | — | ×× |
| Serin | ××× | ××× | ××× | ××× | ××× | ××× | ××× | ××× |
| Threonin | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× | ×× |
| Valin | ×× | ××× | ×× | ××× | ×× | ××× | ×× | ××× |
| „a" | × | ×××× | ×(×) | ××× | × | ×× | × | ×× |
| „b" | (×) | × | (×) | × | — | (×) | — | (×) |
| „c" | × | × | × | × | × | × | (×) | (×) |
| „e" | × | × | × | × | × | × | × | × |

n = Extrakt nicht infizierter Pflanzen; i = Extrakt infizierter Pflanzen.

### 3. Histologische Untersuchungen

Die Blätter wurden nach NOLL (1943) in etwa 1 cm lange Stücke zerschnitten, 15 Minuten in 50% KOH gekocht (Glyzerinbad) und nach dem Auswaschen 40 Minuten mit Methylenblau (1% wäss. Methylenblau : Eisessig = 1 : 10) unter gelegentlichem Schütteln angefärbt und schließlich mit Leitungswasser ausgewaschen. Die Anfärbezeit von 40 Minuten ergab bessere Bilder als die von NOLL vorgeschriebene von 20 Minuten. Die Rosthyphen hoben sich durch intensive Blaufärbung vom farblosen Gewebe ab, Sporen erschienen rötlichbraun.

### 4. Aufarbeitungsverfahren und papierchromatographische Analyse

Zur Aufarbeitung wurden die Blätter gefriergetrocknet; das Trockenpulver wurde mit der gleichen Menge Aceton—Wasser 1 : 1 extrahiert, der Extrakt nach HEITEFUSS (vgl. HEITEFUSS und FUCHS 1960) weiterbehandelt und papierchromatographisch auf Aminosäuren, Zucker und organische Säuren nach den von HEITEFUSS verwendeten Verfahren analysiert. Nur erwies es sich an unserem Material als nötig, vor der Trennung der organischen Säuren den eingeengten wässerigen Pflanzenextrakt nach Ansäuern mit $H_2SO_4$ auf pH 1 im Mikroextraktor nach SLOTTA (vgl. CHERONIS 1958), 30 Stunden auszuäthern; nach Vertreibung des Äthers aus der Extraktionsflüssigkeit wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen. Hierdurch konnte die sonst auftretende „Schwanzbildung" vermieden werden. Als Spezialnachweis für Glykolsäure wurde die Rotviolettfärbung mit 2,7-Dioxynaphthalin nach EEGRIWE (1952) (vgl. PAECH-TRACEY 1955) an Eluaten der entsprechenden Flecke verwendet; meist wurden die Substanzen durch Cochromatographie identifiziert. Die relativen Mengenverhältnisse wurden aus der Größe der Flecke und der Intensität der Färbung geschätzt.

### 5. Gaswechseluntersuchungen

Der Sauerstoffverbrauch wurde nach der Warburgtechnik in gleicher Weise wie von HEITEFUSS bestimmt, der Respirationsquotient nach der „direkten" Methode (vgl. UMBREIT und Mitarb. 1951) (Warburg-Apparat Modell SL 65 der Firma Braun, Melsungen. Der Inhalt der verwendeten Gefäße betrug 15 ml).

## II. ERGEBNISSE

### 1. Veränderungen der freien Aminoverbindungen in einer anfälligen und einer resistenten Sorte (Marquis und Vernal) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion

ROHRINGER (1956) fand an Weizensorten verschiedenen Resistenzgrades — zum Teil charakteristische — qualitative und quantitative infektionsbedingte Veränderungen der Konzentration freier Aminosäuren zum Zeitpunkt der Sporulation des Pilzes. Um über die zeitliche Folge des Infektionsgeschehens, besonders über die ersten Schritte, weitere Aufschlüsse zu erhalten, wurden am Beispiel einer anfälligen (Marquis) und einer resistenten Sorte (Vernal) die Aminosäuren am 3., 5., 7. und 9. Tage nach der Infektion untersucht (Tab. 1 und 2). Es wurden die gleichen Aminosäuren wie von ROHRINGER gefunden, ebenso die von uns nicht identifizierten Flecke „a", „b", „c" und „e". Substanz „e" trat nur in der Sorte Marquis in geringer, von der Infektion unbeeinflußter Konzentration auf. Substanz „c" lag unmittelbar unterhalb der basischen Aminosäuren als langgezogener unscharfer Fleck, dessen Konzentration ebenfalls von der Infektion unbeeinflußt blieb. In infizierten Pflanzen der Sorte Marquis traten zahlreiche Aminosäuren in

*Tabelle 2*

Relative Konzentration der freien Aminoverbindungen in Extrakten der resistenten Sorte „Vernal"

| | Tage nach der Infektion | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | | 5 | | 7 | | 9 | |
| | n | i | n | i | n | i | n | i |
| α-Alanin | XXX | XXX | XXX | XXX | XXX | XXX(X) | XXX | XXXX |
| γ-Aminobuttersäure | — | — | — | — | (X) | (X) | (X) | (X) |
| Asparagin | XXXX | XXXXX | XXXX | XXXXX | XXX(X) | XXXX(X) | XXX(X) | XXXX(X) |
| Asparaginsäure | XX(X) | XX(X) | XX(X) | XX(X) | XX(X) | XX(X) | XX(X) | XXX |
| Cystin | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Glutamin | XXX | XXXX | XXX | XXXX | XXX | XXXX | XXX | XXXX |
| Glutaminsäure | XXX | XXX | XXX | XXX | XXXX(X) | XXXX(X) | XXXXX | XXXXX |
| Glycin | XX | XX | XX | XX | X | X | (X) | (X) |
| Histidin/Arginin | (X) | XX | (X) | XX | (X) | XX | (X) | XX |
| Leucin/Isoleucin | XX | XX(X) | XX | XX | XX | XX | XX | XXX |
| Lysin | (X) | XX | (X) | XX | (X) | XX | — | XX |
| Phenylalanin | — | — | — | — | (X) | X | (X) | X |
| Serin | XXX | XXX | XXX | XXX | XXX | XXX | XXX | XXX |
| Threonin | XX | XX | XX | XX | XX | XX | XX | XX |
| Valin | XX | XX | XX | XX | XX | XX | XX | XXX |
| „a" | — | — | — | — | X | XX | (X) | X(X) |
| „b" | — | — | — | — | — | — | — | — |
| „c" | — | — | — | — | — | — | — | — |
| „e" | — | — | — | — | — | — | — | — |

n = Extrakt nicht infizierter Pflanzen; i = Extrakt infizierter Pflanzen.

höherer Konzentration als in den Kontrollpflanzen auf: bereits am 3. Tage nach der Beimpfung war dies der Fall bei Asparagin, Histidin/Arginin, Leucin/Isoleucin, Lysin, Phenylalanin, Valin, Fleck „a" und Fleck „b". Dieser Konzentrationsunterschied blieb bis zum 9. Tage etwa gleich, mit Ausnahme von Substanz „a", bei welcher er sich verminderte. Bei Glutamin stieg er erst am 7. Tage, zur Zeit der Sporulation des Rostes, an und blieb am 9. Tage in gleicher Stärke vorhanden. Nur $\gamma$-Aminobuttersäure zeigte als einzige Substanz am 7. und 9. Tage eine Mengenabnahme nach der Infektion.

Auch bei der resistenten Sorte Vernal waren die infektionsbedingten Unterschiede durch eine Erhöhung der Aminosäurekonzentration nach der Infektion gekennzeichnet. Bei Asparagin, Glutamin, Histidin/Arginin und Lysin blieb die Konzentration durchgehend vom 3. bis 9. Tage nach der Infektion in gleichem Maße erhöht. $\alpha$-Alanin, Phenylalanin und Substanz „a" nahmen erst zum Zeitpunkt der Sporulation des Pilzes am 7. Tage, Asparaginsäure, Leucin/Isoleucin und Valin am 9. Tage nach der Infektion zu. Bei den übrigen Stoffen trat keine infektionsbedingte Konzentrationsänderung ein.

### 2. Wirkung spezifischer Hemmstoffe auf den Infektionsverlauf

#### a) Das sichtbare Befallsbild

Die Hemmstoffe wurden der Pflanze grundsätzlich zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durch Infiltration zugeführt:

1. Dem gesunden Blatt unmittelbar vor der Beimpfung,
2. 3 Tage nach der Inokulation, um die Beeinflussung des normal begonnenen Infektionsprozesses zu erfassen.

zu 1. Bei Infiltration der Stoffe unmittelbar vor der Beimpfung des Blattes kam der Pilz in keinem Fall zur Fruktifikation. Es traten keine Chlorosen auf, so daß keine Symptome einer Infektion sichtbar wurden.

zu 2. Wurden die Blätter 3 Tage nach der Infektion abgeschnitten und mit den Hemmstofflösungen infiltriert, so zeigte sich am 7. Tage nach der Infektion, zum Zeitpunkt der Sporulation des Pilzes an den unbehandelten Kontrollen, folgendes Bild: TSC hemmte die Weiterentwicklung des Rostes so stark, daß nur vereinzelte, sehr kleine gelbliche Höfe mit kaum wahrnehmbaren Sporenlagern ausgebildet wurden (vgl. FUCHS und BAUERMEISTER 1958). Die SC-Wirkung auf den sichtbaren Befallsverlauf entsprach etwa der des TSC; eine etwas geringere Hemmung ließ die Chlorosen stärker erscheinen und kleine braune Sporenlager deutlich sichtbar werden.

Nach FES-Behandlung glich der Befallsverlauf dem nach TSC-Infiltration: es wurden ebenfalls nur ganz vereinzelt sehr kleine Sporenlager gebildet, umgeben von kleinen gelblichen Chlorosen.

Es erhebt sich die Frage, ob die beobachtete Hemmung durch Einwirkung auf die Entwicklung des Pilzes, durch Beeinträchtigung des Wirtsstoffwechsels

oder auf beiden Wegen zusammen zustande kommt. Nach den beobachteten tiefgreifenden Veränderungen im Stoffwechsel des Wirtes (vgl. S. 228 ff.) ist zumindest dessen Beteiligung anzunehmen. Dies wird dadurch unterstützt, daß in den hier verwendeten Hemmstofflösungen suspendierte und zur Inokulation verwendete Rostsporen normalen Befall hervorriefen und normal fruktifizierende Pusteln hervorbrachten, falls den Blättern nicht zusätzlich Hemmstoff infiltriert oder basal zugeführt wurde.

#### b) Histologische Untersuchungen

Um zu unterscheiden, ob die Hemmwirkung bereits die Keimung der Sporen verhinderte oder ob sie erst zu einem späteren — bei den einzelnen Stoffen eventuell unterschiedlich liegendem — Zeitpunkt einsetzte, wurde die eusymbiontische Phase histologisch verfolgt.

Nach TSC-Infiltration des Blattes vor der Beimpfung keimten die Sporen ungehindert: das substomatäre Bläschen wurde normal gebildet, jedoch endete die Weiterentwicklung mit der Ausbildung kurzer Infektionshyphen, häufig überhaupt nur einer kurzen Hyphe. Bei entsprechender Behandlung des Blattes 3 Tage nach der Beimpfung wurde die Entwicklung der intramatrikalen Hyphen sehr stark reduziert, während in den Kontrollen das gesamte Blatt von dem Myzel durchzogen war und die Sporenlager als rostbraun gefärbte, abgerundete Komplexe sichtbar wurden.

SC wirkte in geringerem Grade als TSC: nach Infiltration vor der Beimpfung kam Hyphenwachstum zustande, das im Vergleich zu Kontrollpräparaten jedoch vermindert war. Wurde die Behandlung 3 Tage nach der Infektion vorgenommen, so wurde das gesamte Blatt von dem Hyphengeflecht durchzogen, jedoch war der Umfang der Uredolager stark reduziert und die Sporenproduktion vermindert, so wie es dem äußeren Erscheinungsbild entsprach.

Nach der Infiltration von FES fielen stark anfärbbare Zellkomplexe auf, die eine Beurteilung des Hyphenwachstums verhinderten. Sie umfaßten nur wenige Zellen, wenn die Infiltration vor der Beimpfung erfolgte. Bei Behandlung nach der Infektion entsprachen sie etwa der Ausbreitung der Hyphen zur Zeit der Behandlung. Nach dem histologischen Bild zu urteilen, wurden ähnliche Erscheinungen schon häufig als Reaktion resistenter Pflanzen auf Pilz- oder Bakterieninfektionen beobachtet (vgl. Noll 1943). Der gebildete „Wundgummi" kann nach Noll durch Einwirkung von Chlor zerstört werden; dies traf in unserem Fall nicht zu. Eine nähere Untersuchung dieser Substanz lag außerhalb unserer Fragestellung. Es kann auch nichts über den ursächlichen Zusammenhang ihrer Bildung mit der FES-Wirkung ausgesagt werden.

### 3. Durch Infektion und Behandlung veränderte Inhaltsstoffe der anfälligen Wirtspflanze

#### a) Freie Aminoverbindungen

Die beobachtete und histologisch untersuchte Beeinflussung des beginnenden Infektionsprozesses wurde durch Querschnittsanalysen — am 3. Tage

nach der Beimpfung — ergänzt, die bei den verschiedenen Hemmstoffen mehr oder weniger charakteristische Veränderungen der Aminosäurekonzentration zeigten (Tab. 3). In diesen Versuchen, bei denen die Blätter 3 Tage vor der biochemischen Aufarbeitung infiziert, abgeschnitten und in Lösungen der betreffenden Hemmstoffe gestellt wurden, traten Methionin und eine unbekannte Substanz, Fleck „f" (wahrscheinlich identisch mit der von HEITEFUSS als Fleck „c" bezeichneten Substanz), auf. Diese waren nicht faßbar, wenn die Blätter unmittelbar nach dem Abschneiden verarbeitet wurden.

*Tabelle 3*

Relative Konzentration der Aminosäuren nach dreitägiger Behandlung und dreitägiger Dauer des Infektionsprozesses

| | Kontrolle | TSC | SC | FES |
|---|---|---|---|---|
| α-Alanin | XXX | XX | XX(X) | XX |
| γ-Aminobuttersäure | X | X | X | X |
| Asparagin | XXXXX | XXX(X) | XXXX | XXXX(X) |
| Asparaginsäure | XXX | XXX | XXX | XXX |
| Cystin | X | XXX | XX(X) | XX |
| Glutamin | XXXX | XXX(X) | XXX(X) | XXXXX |
| Glutaminsäure | XXXXX | XXXXX | XXXXX | XXXXX |
| Glycin | X | XXXX | XXX | X |
| Histidin/Arginin | XX | XXX(X) | XXX | XXX |
| Leucin/Isoleucin | XXX | XXX | XXX | XXX |
| Lysin | X | XX | XX | XX |
| Methionin | XX | XX | XX | XX |
| Phenylalanin | XX | XX | XX | XX |
| Serin | XXX | XXXX | XXXX(X) | XXX |
| Threonin | XX | XXX | XXX | XX |
| Tyrosin | X | X(X) | X(X) | X |
| Valin | XXX | XXX | XXX | XXX |
| „a" | XX | XX | XX | X |
| „b" | X | X(X) | X | X |
| „c" | X(X) | X | X | X |
| „e" | X | X | X | X |
| „f" | X | X | X | X |
| „g" | — | — | X | — |
| „h" | — | — | XX | — |

TSC und SC bewirkten besonders auffällige und mit vergleichbaren Untersuchungen von HEITEFUSS an *Peronospora*-infizierten *Brassica*-Pflanzen im wesentlichen übereinstimmende Veränderungen, nach denen vor allem der Gehalt an Glycin, Serin, Cystin, den basischen Aminosäuren Histidin/Arginin und Lysin und Threonin erhöht war. Eine geringe Konzentrationszunahme war bei Tyrosin, nach Semikarbazidinfiltration auch bei Fleck „b" zu verzeichnen. Die Flecke „g" (unterhalb der Asparaginsäure) und „h" (möglicherweise mit der von ROHRINGER als „d" bezeichneten Substanz identisch) traten nach SC-Behandlung neu auf. Auf eine Identifizierung wurde jedoch verzichtet. Ein

geringe Konzentrationsverminderung zeigten α-Alanin, Asparagin, Glutamin und Fleck „c", diese war nach TSC-Gaben etwas stärker.

FES-Behandlung führte zu relativ geringen Konzentrationsänderungen: Cystin, Glutamin, Histidin/Arginin und Lysin traten der Kontrolle gegenüber vermehrt auf. Eine Verminderung erfuhren α-Alanin, Asparagin, Fleck „a" und Fleck „c". Auch hier besteht eine Parallele zu den Ergebnissen von Heitefuss an *Brassica*, der nach FES-Behandlung ebenfalls eine Zunahme von Glutamin, Histidin/Arginin und Lysin gefunden hatte; Glutamin trat hier sogar in nahezu doppelter Konzentration auf. Demgegenüber konnte eine Mengenabnahme nur bei α-Alanin verzeichnet werden.

### b) Zucker

Unter unseren Bedingungen konnten Glukose, Fruktose und geringe Mengen Saccharose nachgewiesen werden.

Alle Hemmstoffe verminderten den Glukose- und Fruktosespiegel. TSC wirkte auch hier stärker als SC; FES lag in der Mitte.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Heitefuss nahm zwar die Konzentration der Glukose und Fruktose nach TSC- und SC-Behandlung ab, jedoch bestehen auffallende quantitative Unterschiede; denn im Gegensatz zu dem nahezu vollständigen Fehlen der Zucker nach Behandlung von *Brassica* blieben sie hier in allen Fällen gut nachweisbar.

Die Fluoressigsäure beeinflußte bei *Brassica* die nachweisbaren Zucker nicht, während bei diesen Untersuchungen an Weizen eine Mengenabnahme zu verzeichnen war.

### c) Organische Säuren

In den Extrakten ließen sich nachweisen: Bernsteinsäure, Malonsäure, Glykolsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure und Weinsäure. Mit niedrigerem $R_f$-Wert — unmittelbar oberhalb des Startpunktes — waren außerdem einige Stoffe nachweisbar, deren Flecke sich zum Teil überschnitten (Tab. 4).

*Tabelle 4*

Veränderung der relativen Konzentration der organischen Säuren nach Infektion und Behandlung am dritten Tag des Infektionsprozesses

| | nicht infiziert | infiziert | TSC | SC | FES |
|---|---|---|---|---|---|
| Bernsteinsäure .. | XXX | XXX | XXX(X) | XXX(X) | XXX(X) |
| Malonsäure .... | X | X(X) | XX | XX(X) | X |
| Glykolsäure .... | XX | XXX | X(X) | XX | XX |
| Äpfelsäure .... | XX(X) | XXX | XXX | XXX(X) | XXX(X) |
| Zitronensäure .. | XX(X) | XXX | XX(X) | XX(X) | XXXXX |
| Weinsäure .... | XXX | XX | XXX | XXX | XXX |

Auf eine Identifizierung wurde verzichtet, da ihre Konzentration durch die Behandlung nicht deutlich verändert wurde; ihre Identität mit folgenden Säuren konnte jedoch ausgeschlossen werden: Cis-Aconitsäure, Ascorbinsäure, Brenztraubensäure, Chinasäure, Chlorogensäure, Ferulasäure, Fumarsäure, Glyoxylsäure, Kaffeesäure, Maleinsäure, Milchsäure, Oxalsäure, Oxalessigsäure. Die mit Säurereagens nachweisbaren Aminosäuren (Asparagin-, Glutamin- und $\gamma$-Aminobuttersäure) schieden aus, da sie nicht in den Ätherauszug übergehen; positive Reaktion mit Ammonmolybdat in $H_2S$ (vgl. PAECH-TRACEY 1955) wies bei mindestens einem dieser Flecke auf Phosphorverbindungen hin, die in diesem Zusammenhang aber nicht weiter untersucht wurden.

In infizierten Pflanzen stieg die Menge der Glykolsäure und in geringem Umfang auch die der Malonsäure, Äpfelsäure und Zitronensäure gegenüber den nicht infizierten Kontrollpflanzen an. Weinsäure trat nach der Infektion in geringerer Konzentration auf, die Menge der Bernsteinsäure blieb unbeeinflußt. Diese relativ geringen Veränderungen zu Anfang des Infektionsprozesses stimmen damit überein, daß STAPLES (1956) stärkere Säureanreicherung erst nach Ende der eusymbiontischen Phase fand: das Maximum der Zitronen- und Äpfelsäuremenge wurde zur Zeit der Uredosporenausschüttung durchlaufen, der Malonatgehalt stieg bei der Alterung des Blattes am stärksten, während die Konzentration der Bernsteinsäure durch den Infektionsprozeß kaum beeinflußt wurde.

Nach der Infiltration von Hemmstofflösungen ergaben sich folgende Konzentrationsveränderungen:

Durch TSC-Behandlung waren Bernstein-, Malon- und Weinsäure im Vergleich zu nicht behandelten Pflanzen ein wenig angereichert, die Glykolsäure auf etwa die halbe Menge vermindert, Zitronensäure nahm ein wenig ab.

Nach SC-Behandlung nahm die Menge der Bernstein-, Malon- und Weinsäure ebenfalls in geringem Umfang zu, ebenso auch die der Äpfelsäure. Demgegenüber fiel die Menge der Glykolsäure und Zitronensäure ab.

Nach FES-Behandlung fiel besonders die Zunahme der Zitronensäure gegenüber unbehandelten, infizierten Pflanzen auf. Die Konzentration der Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Weinsäure stieg in geringem Umfang an, die der Malonsäure und Glykolsäure war etwas vermindert.

### 4. Gaswechseluntersuchungen

#### a) Bedeutung der Lichtintensität und des Zeitpunktes nach der Infektion für die Beeinflussung der $O_2$-Aufnahme durch Fluoressigsäure und Malonsäure

Durch die Infektion wird die $O_2$-Aufnahme der Blätter stark erhöht (GÄUMANN 1951, ROHRINGER 1959). In unseren zahlreichen Versuchen schwankte diese Steigerung zwischen 200 und 325 %, sie lag 8 Tage nach der Beimpfung im Mittel bei 254 %. Die großen Schwankungen sind überwiegend durch den mittelbaren und unmittelbaren Einfluß der Umwelt auf das Wechselspiel von Wirt und Parasit, insbesondere durch schwankenden Lichtgenuß bedingt. Hierdurch wird offensichtlich auch das Ausmaß von Hemmwirkungen beeinflußt, wie schon HEITEFUSS (1957) für die Fluoracetathemmung, FARKAS, KONRAD und KIRALY (1957) für die Malonathemmung annehmen.

Da unter natürlichen Lichtbedingungen außerordentlich große Schwankungen auch in unseren Versuchsergebnissen auftraten, wurden daher die Pflanzen einen Tag nach der Infektion unter konstante Lichtbedingungen gestellt: gut belichtete Pflanzen unter etwa 7 000 Lux und wenig belichtete unter etwa 3 000 Lux. In diesen Versuchsserien sollte gleichzeitig die Veränderung der Hemmstoffempfindlichkeit im Verlaufe des Infektionsprozesses untersucht werden; daher erfolgten die Messungen in den ersten Tagen des Infektionsprozesses (2, 3, 4 und 5 Tage nach der Infektion) und zur Zeit der Sporulation des Pilzes am 8. Tage (vgl. auch Fuchs und Siebert 1959).

Die Hemmung der $O_2$-Aufnahme gut belichteter Pflanzen durch Fluoressigsäure sank zu Beginn des Infektionsprozesses am 3. Tage auf ein Minimum und stieg dann erneut auf den Ausgangswert. Zur Zeit der Sporulation war die Hemmung mit etwa 30 % wieder geringer. Bei wenig belichteten Pflanzen war zunächst die Hemmung größer als bei gut belichteten, sank jedoch dann stärker ab und erreichte am 4. Tage ein deutlich ausgeprägtes Minimum. Die Verspätung dieses Minimums entsprach einer ähnlichen Verzögerung der Sporulation des Pilzes auf den unterbelichteten, leicht etiolierten Pflanzen. Am 8. Tage, zur Zeit der Sporulation, war die Hemmung mit etwa 28 % ähnlich wie bei den gut belichteten (Abb. 1).

Die Malonathemmung stimmte in ihrer Tendenz mit der Hemmung durch Fluorazetat überein. Auch hier war die Hemmung der $O_2$-Aufnahme anfangs bei schwach belichteten Pflanzen stärker als bei gut belichteten. Sie durchlief dann am 4. Tage ein ausgeprägtes Minimum und blieb weiterhin geringer. Minimum und Maximum waren weniger stark ausgeprägt als bei der Fluorazetathemmung. Am 8. Tage betrug die Hemmung etwa 15 %.

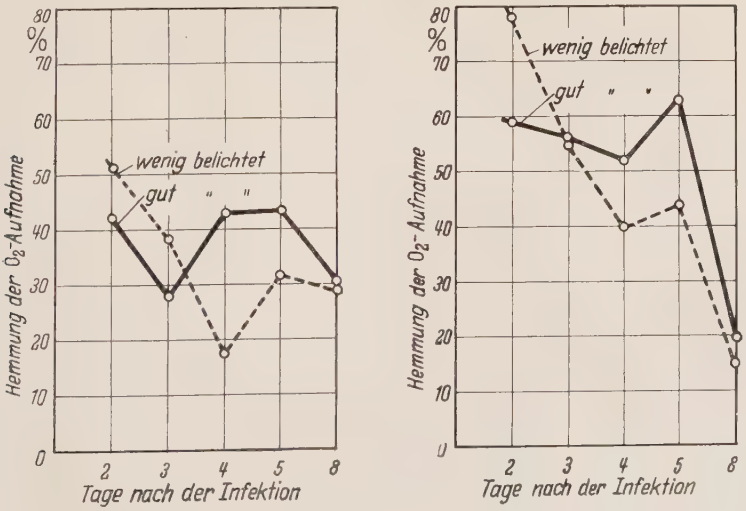



Abb. 1 (links). Hemmung der $O_2$-Aufnahme infizierter Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten und bei unterschiedlicher Lichtintensität durch Fluoressigsäure

Abb. 2 (rechts). Hemmung der $O_2$-Aufnahme infizierter Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten und bei unterschiedlicher Lichtintensität durch Malonsäure

Nach guter Belichtung sank die Hemmung in den ersten Tagen des infektiösen Prozesses nur langsam ab, stieg etwa am 4. Tage wieder deutlich an und fiel schließlich am 8. Tage auf etwa 20 %.

Der Umschlag in der Rangfolge der Hemmung bei verschieden belichteten Pflanzen lag für beide Hemmstoffe in dem Ende der ersten Phase des Infektionsprozesses, etwa in der Zeit zwischen dem 3. und 4. Tage nach der Beimpfung.

**b) Atmungsintensität und Respirationsquotient unter dem Einfluß von Thiosemicarbazid**

Zur weiteren Analyse der Anfangsphase des Infektionsprozesses wurde zu verschiedenen Terminen TSC infiltriert und die Veränderung der $O_2$-Aufnahme gemessen; diese wurde je nach Zeitpunkt und Dauer der TSC-Einwirkung entweder vermindert oder verstärkt:

Wurde z. B. am 3. Tage nach der Inokulation $2 \times 10^{-3}$ mol TSC unmittelbar vor der „Atmungsmessung" in die Blätter infiltriert, betrug die Hemmung der $O_2$-Aufnahme etwa 15 %; wurde dagegen die Behandlung schon zur Zeit der Inokulation vorgenommen, so daß die Pflanzen 3 Tage unter TSC-Wirkung standen, war die $O_2$-Aufnahme am 3. Tage um durchschnittlich 11 % erhöht; durch weitere TSC-Zugabe vor der Messung trat eine weitere Steigerung um etwa 7 % ein.

Diese an sich geringen Unterschiede ließen sich in zahlreichen Wiederholungen des Versuches reproduzieren. Sie schließen zumindest eine Verminderung der „Atmungsintensität" durch die gewählten Behandlungen aus, bedürfen im übrigen aber sehr vorsichtiger Interpretation. Offensichtlich handelt es sich um eine recht spezifische Wirkung der TSC-Vorbehandlung, da eine solche mit SC, das sonst in vieler Hinsicht ähnlich wirkt, keine Steigerung der $O_2$-Aufnahme nach zusätzlicher TSC-Behandlung vor der „Atmungsmessung" hervorrief. Der Respirationsquotient blieb während der dreitägigen Vorbehandlung mit TSC in jedem Falle unbeeinflußt: er wich in allen Fällen kaum von 1,0 ab.

Um diese TSC-Wirkung näher zu kennzeichnen, wurde die $O_2$-Aufnahme vorbehandelter Blätter auch unter dem Einfluß von Semicarbazid, Fluoressigsäure und Malonsäure untersucht: in den ersten 3 Tagen nach der Beimpfung waren die mit TSC vorbehandelten Pflanzen gegenüber diesen Hemmstoffen etwa gleich empfindlich wie mit Wasser vorbehandelte (vgl. z. B. Abb. 3).

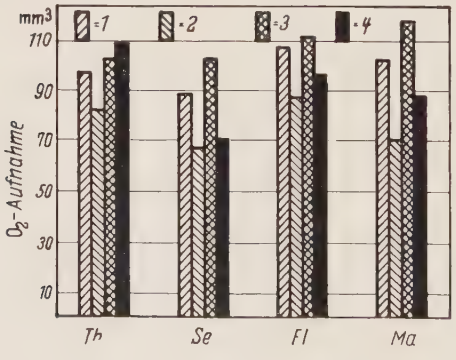



Abb. 3. Beeinflussung der $O_2$-Aufnahme durch Thiosemicarbazid in Kombination mit anderen Hemmstoffen. 1 = Vorbehandlung mit Wasser, 2 = Vorbehandlung mit Wasser, vor der Messung Zugabe von Hemmstoff, 3 = Vorbehandlung mit Thiosemicarbazid, 4 = Vorbehandlung mit Thiosemicarbazid, vor der Messung Zugabe von Hemmstoff. Die verwendeten Hemmstoffe: Th = Thiosemicarbazid, Se = Semicarbazid, Fl = Fluoressigsäure, Ma = Malonsäure

Es scheinen also die durch die zuletzt erwähnten Hemmstoffe beeinflußbaren Systeme durch die TSC-Vorbehandlung nicht qualitativ verändert zu sein, während TSC offensichtlich nach Vorbehandlung an anderer Stelle eingreift, als ohne eine solche.

## III. DISKUSSION

### 1. Zur Bedeutung infektbedingter Veränderungen einzelner freier Aminoverbindungen

Dem Protein- und Aminosäurestoffwechsel wird seit langem eine zentrale Stellung im postinfektionellen Geschehen eingeräumt. Die meisten älteren Untersuchungen zu diesem Problem beziehen sich auf infektionsbedingte Veränderungen des Gehaltes an Gesamtstickstoff oder an bestimmten Stickstofffraktionen. Erst in letzter Zeit wurde die Beeinflussung bestimmter Aminosäuren durch das Infektionsgeschehen an einigen Wirt-Parasit-Kombinationen analysiert. Unter Hinweis auf die seit Abschluß unserer Versuche erschienenen zusammenfassenden Darstellungen (Allen 1959, Uritani 1959, Rohringer 1959) verzichten wir auf ausführliche Diskussionen.

Die Deutung aller an bestimmten Wirt-Parasit-Paaren modellmäßig gewonnenen Ergebnisse wird dadurch erschwert, daß mangels umfassender Untersuchungen an einem Paar die Befunde von ganz verschiedenen Objekten vergleichend herangezogen werden müssen. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß die Analysen bei unterschiedlichen Ernährungs- und Umweltbedingungen und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Infektionsverlaufes durchgeführt wurden. Wie Rohringer (1957) bereits annimmt, unterscheiden sich die „verschiedenen Phasen der parasitären Symbiose auch hinsichtlich der Veränderungen des Aminosäurespiegels voneinander".

Ehe wir auf unsere einschlägigen Beobachtungen zurückkommen, muß auf die Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen und den am gleichen Modell gewonnenen Befunden Rohringers (1957) eingegangen werden. Dieser fand — zur Zeit der Sporulation des Schwarzrostes — an zwei Weizensorten trotz unterschiedlichen Resistenzgrades gleichsinnig eine Verminderung des Spiegels der meisten Aminosäuren im infizierten Gewebe; nur die Konzentration von Glutamin stieg in allen Fällen an.

Unsere Untersuchungen ergaben demgegenüber einen infektionsbedingten Konzentrationsanstieg einzelner Aminosäuren sowohl für die „anfällige" als auch für die „resistente" Sorte. In beiden Sorten werden meist die gleichen Aminosäuren, vor allem die basischen Substanzen, von der Infektion beeinflußt, jedoch setzen je nach dem Resistenzgrad die Veränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation ein.

#### a) Die Aminosäurekonzentration in infizierten Geweben

Die von uns am 3. bis 9. Tage nach der Beimpfung beobachtete Konzentrationszunahme betrifft — in gegenläufiger Richtung! — die gleichen Aminoverbindungen, deren Verminderung Rohringer am gleichen Objekt am

7. Tage nach der Inokulation festgestellt hatte, nämlich Histidin/Arginin, Lysin, Substanz „a", Substanz „b", Asparagin, Leucin/Isoleucin, Phenylalanin und Valin. Übereinstimmend wurde dagegen in beiden Untersuchungen ein Konzentrationsanstieg von Glutamin bei der Sorte Marquis und von α-Alanin und Asparaginsäure bei der Sorte Vernal gefunden.

Die Tatsache, daß die gegenläufigen Veränderungen nur in infizierten Pflanzen gefunden wurden, während die relativen Mengen der Aminosäuren in den nicht infizierten Pflanzen in beiden Untersuchungen nahezu übereinstimmten, schließt Unterschiede des Aufarbeitungsverfahrens als Ursache des Widerspruchs weitgehend aus, zumal mit der gleichen Extraktionsmethode gearbeitet wurde. Vielmehr muß eine Klärung aus der Betrachtung des Eingriffs des Parasiten im Zusammenhang mit den speziellen Versuchsbedingungen versucht werden. Hierfür ergeben sich zwei Anhaltspunkte:

1. Es wurde trotz Gleichheit des Infektionstyps mit anderen Schwarzrostrassen gearbeitet;
2. Während der Anzucht und im Verlauf des Infektionsprozesses waren die Pflanzen unterschiedlichen Lichtbedingungen ausgesetzt.

Die weitgehende Spezialisierung des Schwarzrostes läßt nicht ohne weiteres erwarten, daß die Auseinandersetzung verschiedener Rassen mit einer Wirtssorte sich in identischen Veränderungen der Inhaltstoffe widerspiegelt; allerdings fehlen vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Rassen, die dies eindeutig klären könnten. Wir haben lediglich eine orientierende Aufarbeitung der Sorte Marquis am 3. Tage nach der Beimpfung mit Rasse 21 durchgeführt, welche auf der Sorte Marquis den gleichen Infektionstyp hervorbringt wie die Rassen 126 A (ROHRINGER) und 32 (unsere Versuche). Hierbei ergab sich ebenfalls die Tendenz des Aminosäureanstiegs.

Die Bedeutung des Lichtfaktors ist eingehender zu diskutieren: ROHRINGER weist ausdrücklich darauf hin, daß die beiden Sorten Marquis und Vernal besonders schlechten Lichtbedingungen — im Tagesmittel 2 000 bis 3 000 Lux! — ausgesetzt waren. Demgegenüber stand mit Hilfe der starken Zusatzbeleuchtung unseren Versuchspflanzen eine gut ausreichende Lichtmenge zur Verfügung.

Verbesserte Lichtbedingungen führen meist zu einer im Infektionstyp ausgedrückten Erhöhung der Rostanfälligkeit (GÄUMANN 1951). Nun war zwar in den Untersuchungen von ROHRINGER durch die schlechten Lichtbedingungen der Infektionstyp noch nicht verändert; aus verminderter Größe der Uredolager und geringerer Sporenproduktion konnte er aber auf unzureichende Beleuchtung schließen, während wir normale, zum Teil übernormale Pustelentwicklung beobachteten. Ein Vergleich beider Untersuchungen ergibt also eine Korrelation zwischen guter Rostentwicklung und der Zunahme von Aminosäuren und entsprechend zwischen geringerer Rostentwicklung und der Abnahme der Aminosäuren; in beiden Fällen unterliegt die Konzentration der gleichen Aminosäuren einer Veränderung.

Eine weitere Stütze finden unsere Überlegungen darin, daß verschiedenartige Behandlungen, welche die Resistenz herabsetzen, zu einem Anstieg des Spiegels der löslichen Kohlenhydrate und Stickstoffverbindungen führen, und

alle Eingriffe, die eine „massive" Anreicherung solcher Verbindungen zur Folge haben, erhöhte Rostanfälligkeit bedingen, wobei der Verfügbarkeit von Aminosäuren besondere Bedeutung für die Rostentwicklung beigemessen wird (Forsyth und Samborski 1958, Samborski, Forsyth und Person 1958).

Eine orientierende Aufarbeitung infizierter Pflanzen, die bei unterschiedlicher Lichtintensität (etwa 3000 und 7000 Lux) gehalten worden waren, bestätigt den Zusammenhang zwischen Lichtfaktor und der Menge freier Aminoverbindungen. Im Vergleich zu den gut belichteten Pflanzen wurde in den wenig belichteten die Konzentration fast aller Aminosäuren herabgesetzt; nur α-Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure blieben als einzige unbeeinflußt. Diese stehen als „Grundaminosäuren" in Schlüsselpositionen des Stoffwechsels, so daß sich ein Defizit bei ihnen zuletzt bemerkbar machen bzw. am besten ausgeglichen werden dürfte.

Grundsätzlich sind für die Anhäufung der Aminosäuren im infizierten Gewebe 3 Möglichkeiten denkbar: durch die Infektion kann die Stoffwechsellage im Sinne einer Synthese von Aminosäuren verändert, der Einbau von Aminosäuren in Proteine gehemmt oder der Proteinabbau begünstigt sein.

Im ersten Falle würde es sich um einen energieverbrauchenden Syntheseweg handeln, den der Pilz unmittelbar oder über die Reaktion der Wirtspflanze auslöst; solche Möglichkeiten werden heute ernstlich in Erwägung gezogen (Uritani 1959, Rohringer 1959), ohne daß klare Vorstellungen über den Mechanismus erarbeitet sind. Die Hypothese, daß ausreichende Lichtversorgung für eine solche induzierte Synthese von Aminosäuren Voraussetzung ist, könnte aber nur auf Grund größeren Versuchsmaterials erörtert werden.

Ein Eingriff in den Proteinstoffwechsel, dessen zentrale Bedeutung für das Wirt-Parasit-Verhältnis frühzeitig Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und Überlegungen war (Rohringer 1957, 1959), ist stoffwechselphysiologisch wahrscheinlicher. Als Folge einer Hemmung der Proteinsynthese oder einer Förderung abbauender Prozesse wäre ein Absinken des Proteinstickstoffs in infizierten Pflanzen zu erwarten. Dies ist jedoch nicht immer der Fall (vgl. Gassner und Franke 1938 u. a.); auch qualitative Veränderungen der Eiweißkörper nach der Infektion ließen sich nicht immer chemisch nachweisen (Rohringer 1957). Wahrscheinlich sind je nach den Verträglichkeitsverhältnissen der untersuchten Wirt-Parasit-Paare im Verlaufe der Symbiose abbauende und aufbauende Vorgänge (letztere sicher im Parasiten) möglich. Ein gleichbleibender Proteinspiegel könnte — trotz gleichzeitiger Hemmung des Proteinaufbaues oder Förderung des Proteinabbaues — anknüpfend an die Gedanken von Gassner und Franke eine Klärung finden, wenn — in einem gegenläufigen Prozeß — eine Neubildung von Protein angenommen wird; denn die Synthese der Proteine ist nicht nur eine Umkehr ihres Abbaues; der Proteinaufbau kann vielmehr leichter über Zucker und Glutamin sowie Glutaminsäure als Ausgangspunkte verlaufen als über die im Gewebe gespeicherten Aminosäuren. Letztere werden z. B. von Steward und Thompson (1954) mehr als Abbau- und Speicherprodukte, weniger als Zwischenprodukte der Synthese angesehen, welche u. U. auf anderen Wegen verläuft.

In Anbetracht der vielschichtigen Verknüpfung von Wirt und Parasit, in welcher gerade bestimmte, in sehr kleinen Mengen vorhandene Aminosäuren als entscheidend für die Rostentwicklung angesehen werden müssen (SAMBORSKI, FORSYTH und PERSON 1958), sollen keine allzuweiten Folgerungen aus den vorliegenden Untersuchungen gezogen werden; sie deuten auf eine verständliche Erhöhung des Proteinumsatzes und weisen auf die starke Abhängigkeit des Aminosäurepools von der Belichtung hin.

#### b) Asparagin und Glutamin

Die Asparaginkonzentration ist nach der Infektion in anfälligen und resistenten Pflanzen andauernd erhöht, die des Glutamins nur in der resistenten Sorte, während sie bei der anfälligen ebenso wie in ROHRINGERS Versuchen erst vom Zeitpunkt der Sporenbildung an zunimmt. Hierfür macht ROHRINGER (1957) das reichliche Vorkommen des Glutamins in Uredosporen verantwortlich. Demgegenüber fällt jedoch die Gegenläufigkeit der Konzentrationsänderungen mit $\gamma$-Aminobuttersäure und die bereits früher einsetzende Erhöhung des Glutaminspiegels in der resistenten Sorte auf.

Es liegt nahe, die Anhäufung des Asparagins in den vorliegenden Versuchen auch als Folge eines Abbaus bzw. verstärkten Umsatzes im Proteinstoffwechsel zu deuten. Die engen Beziehungen zwischen dem Amid- und dem Kohlenhydratstoffwechsel (MOTHES 1940, WAELSCH 1952) könnten die Mengenabnahme des Asparagins schlecht belichteter Pflanzen (ROHRINGER 1957) um so verständlicher machen, als der Weizen zu den „Asparaginpflanzen" (SCHWAB 1936) zu zählen ist. Dies könnte auch die größere Labilität des Asparaginspiegels im Vergleich zu der mehr oder minder ausgeprägten Zunahmetendenz des Glutamins erklären. Inwieweit letztere in unserem Falle mit einem lebhafteren Proteinumsatz verknüpft sein könnte, läßt sich schwer entscheiden.

### 2. Stoffliche Veränderungen und Gaswechseluntersuchungen als Grundlagen der Zerlegung des Infektionsprozesses in physiologisch unterschiedliche Phasen

Schon in der Ausprägung der Symptome zeichnen sich aufeinanderfolgende Phasen im Zusammenleben von Wirt und Parasit ab. Umwelt und Ernährungsbedingungen können sich je nach der während der parasitären Symbiose sich ändernden Stoffwechsellage unterschiedlich auswirken (vgl. ROEMER, FUCHS und ISENBECK). Eingehender wurde eine solche Gliederung des infektiösen Prozesses in stoffwechselphysiologisch unterschiedene Phasen von SEMPIO (1939, 1950) erörtert. In letzter Zeit konnten SHAW und HAWKINS (1958) an rost- und mehltaubefallenen Pflanzen eine Phasenfolge aus stoffwechselphysiologischen und biochemischen Veränderungen ableiten. Auch unsere Ergebnisse weisen auf physiologisch unterschiedliche Phasen des Symbioseverlaufs hin:

#### a) Verhalten einzelner Aminosäuren im Laufe des Infektionsprozesses

Der Zeitpunkt, zu dem die Konzentration einzelner Aminosäuren erhöht erscheint, zeigt Phasenverschiebungen an, wobei sich Unterschiede je nach

dem Resistenzgrad andeuten. Während bei der „anfälligen" Sorte die Anhäufung der meisten Aminosäuren vom 3. Tage an erfolgt, findet bei der „resistenten" Sorte eine abgestufte Zunahme einzelner Aminosäuren an aufeinanderfolgenden Untersuchungsterminen statt, wobei zuerst nur die basischen Stoffe am 3. Tage nach der Beimpfung erhöhte Werte ergaben.

Wir sehen darin eine Parallele zu den Befunden von Shaw und Hawkins über den unterschiedlichen Gehalt an Indolylessigsäure und Indolylessigsäureoxydase zu verschiedenen Phasen: der Phasenwechsel liegt bei einer anfälligen Sorte am 3. Tage des Infektionsprozesses, bei resistenten Pflanzen ist er hingegen bis zum 6. Tage nach der Infektion verzögert; alle Eingriffe, die zu einer Verkürzung von „Phase 1" und einem schnelleren Übergang zu „Phase 2" führen, bewirken teilweisen oder vollständigen Verlust der Resistenz.

In Übereinstimmung damit fanden wir bei der in unserem Falle anfälligen Sorte Marquis eine kurze erste Phase, in der bereits die Zunahme der Aminosäuren einsetzt, bei der resistenten Sorte Vernal dagegen eine Verzögerung dieses Anstiegs, den wir als Verlängerung der ersten Phase deuten. Dies entspräche auch der Bedeutung, die der Anhäufung niedrigmolekularer Stoffwechselprodukte, besonders von Aminosäuren, für die Rostentwicklung zugeschrieben wird (z. B. Forsyth und Samborski 1958). Dies liegt auch im Rahmen der Arbeitshypothese von Samborski und Shaw (1957), daß Rost und Mehltau als obligate Parasiten ein „early establishment of a local ‚field' of ‚dominance'" neben möglichen anderen Bedingungen für ihr Gedeihen erfordern (vgl. auch Shaw und Hawkins 1958).

**b) Fluorazetat- und Malonathemmung der $O_2$-Aufnahme in Abhängigkeit vom Lichtfaktor und dem Zeitpunkt des Infektionsprozesses**

Die Beeinflußbarkeit der $O_2$-Aufnahme durch Fluoressigsäure und Malonsäure schwankt in weiten Bereichen, zeigt jedoch deutliche Abhängigkeit von der Belichtungsintensität und dem jeweiligen Stadium des Infektionsprozesses. Dies charakterisiert frühere Hinweise auf die Bedeutung der Lichtbedingungen in Hemmversuchen (Fuchs und Heitefuss 1957, Heitefuss 1957, Farkas, Konrad und Kiraly 1957).

Die prozentuale Malonathemmung nach 8 Tagen liegt in der gleichen Größenordnung wie in den Versuchen von Kiraly und Farkas (1955) sowie von Farkas und Kiraly (1955). Der Verlauf der Hemmung in den vorangehenden Tagen erfordert aber besondere Beachtung im Hinblick auf die Phasenhypothese. Etwa am dritten Tage liegt ein „Umschlagspunkt", von dem ab die gut belichteten Pflanzen mit einer stärkeren Abnahme der $O_2$-Aufnahme auf die Hemmstoffe reagieren. Es tritt deutlich eine Beziehung zu den eben erörterten Befunden an anfälligen Pflanzen auf, nach denen sich eine Phasenänderung nach dem 3. Tage des Infektionsprozesses ergab. Der Zeitpunkt des Umschlags stimmt mit den Angaben von Sempio gut überein, der auch auf einen unterschiedlichen Einfluß des Lichtes auf verschiedene Phasen abhebt und den Übergang zwischen den ersten beiden Phasen auf den 3. bis 4. Tag nach der Infektion ansetzt.

Die verminderte Hemmbarkeit infizierter Pflanzen und der eigentümliche Verlauf der Hemmungswerte während der parasitären Symbiose lassen sich heute nicht befriedigend deuten. Für die auffälligen Unterschiede gegen Ende des Krankheitsprozesses nehmen KIRALY und FARKAS (1955) an, daß sich die „toxininduzierte Atmung der Pflanzen durch neue biochemische Mechanismen vollzieht". Für einen solchen, dessen Endprodukte nicht über den Trikarbonsäurezyklus veratmet werden, führen sie als Beispiel parasitogen verstärkte aerobe Gärung an.

Es ist die Frage, ob diese Annahme zur Deutung der phasenabhängigen Veränderungen der Hemmwerte in dem anfänglichen Zusammenleben der Partner genügt. Jedenfalls muß eine Ablenkung der Abbauwege vor oder während des Durchlaufens des Tricarbonsäurezyklus in erster Linie zur Diskussion gestellt werden: allerdings reicht das uns bekannte Tatsachenmaterial nicht dazu aus, zwischen den verschiedenen Möglichkeiten — verstärkte Einschaltung der aeroben Gärung, der Direktoxydation oder möglicher Kurzschlüsse der Zyklen — zu entscheiden.

Eine andere Deutungsmöglichkeit würde darin bestehen, daß die Empfindlichkeit des Tricarbonsäurezyklus gegen die verwendeten Inhibitoren sich von Phase zu Phase ändert, etwa dadurch, daß die Hemmstoffe ab- oder umgebaut werden können. Dies muß insbesondere für die besonders einprägsamen Ausschläge bei der Malonathemmung in Betracht gezogen werden. Malonsäure, deren aus Fermentversuchen wohlbekannte kompetitive Hemmwirkung auf Bernsteinsäuredehydrogenase in diesen Versuchen ausgenutzt werden soll, ist — im Gegensatz zur FES — auch als Stoffwechselprodukt bekannt. Sie wurde u. a. neuerdings in zahlreichen Pflanzen — einschließlich Getreidearten — gefunden (SHANNON, YOUNG und DUDLEY 1959), so wie wir sie in Weizen feststellen konnten. Ihre Stellung im Stoffwechsel ist noch nicht hinreichend geklärt. Jedoch kann in der Pflanze zugeführte Malonsäure verarbeitet werden, wie die Ergebnisse der Verfütterung markierter Malonsäure an Getreide zeigen. Die Geschwindigkeit derartiger Umsetzungen könnte in den einzelnen Phasen verschieden sein. Der Trend der Fluorazetathemmung könnte allerdings kaum auf diesem Wege erklärt werden, da vorerst keine Beweise metabolischer Veränderungen der FES vorliegen.

### 3. Einfluß der infektionshemmenden Substanzen auf Befallsverlauf, Inhaltsstoffe und Gasaustausch infizierter Pflanzen

Durch längere Einwirkung von Hemmstoffen werden tiefgreifende Veränderungen im Befallsverlauf, im Gehalt an verschiedenen Inhaltsstoffen und im Gasaustausch hervorgerufen, wie CHRISTIANSEN-WENIGER (1955), WALKER und STAHMANN (1955), HEITEFUSS (1957) u. a. zeigten. Die beobachteten Wirkungen lassen erkennen, daß die Hemmstoffe in die Zellen tatsächlich eindringen, und deuten darauf hin, daß sie am Wirtstoffwechsel angreifen. Hierfür sprechen auch unsere Befunde, daß in Hemmstofflösungen suspendierte Uredosporen normal infektionstüchtig sind und die weitere Entwicklung der

parasitären Symbiose ungestört verläuft, falls nicht zusätzlich Hemmstoff über den Wirt geboten wird.

Alle drei hier untersuchten Hemmstoffe verhindern die Weiterentwicklung des Befalls, falls sie zu Beginn oder während der ersten Phase des Infektionsprozesses infiltriert werden. Diese krasse Wirkung kann auch nicht dadurch gemildert werden, daß den infizierten Blättern zusätzlich Glukose geboten wird (Siebert, unveröffentlicht), welche sonst befallsfördernd wirkt (vgl. Pohjakallio 1932).

Die Wirkung ist recht spezifisch, wie das unterschiedliche histologische Bild erkennen läßt. Vielleicht deuten sich hier Unterschiede des Wirkungsweges an. Ob dieser über besonders wirksame Umwandlungsprodukte der zugesetzten Hemmstoffe geht, ist nicht klar: FES dürfte in bekannter Weise über eine letale Synthese den Trikarbonsäurezyklus hemmen. Ob TSC, das zum Teil rasch in der Pflanze verändert werden kann (Nielsen 1960), unmittelbar auf die Infektion wirkt, läßt sich zur Zeit nicht sagen. Die Bedeutung, die — allerdings komplizierter gebaute — Thiosemikarbazone als Tuberkulostatika erlangt haben (z. B. Koch und Stüttgen 1950, Ravnay, Forro und Szegö 1954), legt es nahe, weiterhin die Bildung wirksamer Umsetzungsprodukte dieser Art im Auge zu behalten.

Nach Thiosemikarbazidbehandlung bestätigen sich an unserem Objekt in den wichtigsten Punkten die Ergebnisse von Heitefuss an *Peronospora*-infiziertem Kohl, nämlich die allgemeine Konzentrationszunahme der Aminoverbindungen unter hervorstechender Anhäufung von Glycin. Es wird deutlich, daß diese Veränderungen bereits zu Beginn der eusymbiontischen Phase einsetzen können.

Heitefuss kommt zu keiner eindeutigen Vorstellung über die Ursachen dieser Anreicherung. Im Vordergrund der Diskussion steht eine Verschiebung des Transaminasegleichgewichts durch eine Blockierung der Aldehydgruppe im Pyridoxal-5-Phosphat. Neue Versuche von Nielsen (1960) könnten diese Ansicht unterstützen, obgleich sie auch eine Reihe weiterer Angriffspunkte aufzeigen. Schwierig bleibt die Deutung der außerordentlich großen Zunahme des Glycins, die nach neueren Untersuchungen (Rudolph, unveröffentlicht), bei gleichzeitiger Anhäufung von Glyoxylsäure noch größer ist, als die Chromatogramme erkennen lassen. Die Veränderungen im Bereich der organischen Säuren bieten vielleicht eine bessere Deutungsmöglichkeit: es fällt eine beachtliche Verminderung des Glykolsäurespiegels unter TSC-Einfluß auf. Nach Tolbert und Cohan (1953) wird markierte Glykolsäure in Gersten- und Weizenblättern überwiegend in Glycin und Serin umgewandelt. Dies legt nahe, auch im vorliegenden Fall eine direkte Beziehung zwischen der Verminderung der Glykolsäure und der Anreicherung des Glycins um so mehr zu suchen, als auch Serin und Cystin (also die ganze „Serinfamilie“ [Yemm und Folkes 1958]) in gleicher Richtung beeinflußt werden.

Jedenfalls ist durch TSC-Behandlung die Stoffwechsellage der Pflanzen tiefgreifend verändert. Dies äußert sich auch darin, daß die $O_2$-Aufnahme nach dreitägiger TSC-Behandlung der Blätter größer ist als die der Kon-

trollen, und daß weiterer TSC-Zusatz vor der Messung noch eine geringe Erhöhung der $O_2$-Aufnahme bedingt, während unbehandelte Blätter durch einen solchen Zusatz verminderten Gasumsatz zeigen.

Semikarbazid wirkt im allgemeinen etwas schwächer als TSC auf den Aminosäurespiegel. Dies gilt auch für Veränderungen im Bereich der organischen Säuren, jedoch ist eine Verminderung der Glykolsäure noch deutlich.

Auf Grund der übereinstimmenden Reaktionsmöglichkeit von TSC und SC als Carbonylreagenz könnten bei gleicher Konzentration identische, mindestens ähnliche Wirkungen erwartet werden. Dies trifft aber, wie die Gaswechseluntersuchungen zeigen, nicht zu. Eine dreitägige Vorbehandlung der Blätter mit SC ruft keine Steigerung der $O_2$-Aufnahme bei erneuter Zugabe des Stoffes vor Beginn der Messung hervor, wie es bei entsprechender TSC-Behandlung der Fall ist; die für TSC angenommene Veränderung der Stoffwechsellage ist hier also nicht gegeben. Auch im biochemischen Querschnitt bestehen kleine Abweichungen; die histologischen Präparate zeigen eindeutig die „schwächere" Wirkung des SC. Dies könnte mit geringerer Stabilität des SC im Stoffwechsel zusammenhängen oder aber damit, daß die TSC-Wirkung entscheidend durch den Schwefelgehalt bestimmt ist. Gegen die zweite Möglichkeit scheint der in wesentlichen Punkten gleiche Trend der biochemischen Veränderungen zu sprechen. Darüber hinaus kommen aber dem TSC durch die Thioharnstoffgruppierung über das SC hinausgehende Einwirkungsmöglichkeiten zu (NIELSEN 1960), ganz abgesehen von der oben diskutierten Möglichkeit, daß Verbindungen oder Derivate des TSC auf unterschiedlichen Wegen wirksam werden könnten.

Unsere Versuche über die Wirkung einer FES-Behandlung stützen in etwa die Auffassung von HEITEFUSS (1957), daß der Trikarbonsäurezyklus im Wege der letalen Synthese beeinträchtigt ist: Unter den organischen Säuren ist dementsprechend die Menge der Zitronensäure am auffallendsten erhöht. Jedoch läßt sich auch eine schwache Zunahme der Bernstein- und Äpfelsäure feststellen, die nach Blockierung des Trikarbonsäurezyklus nicht zu erwarten ist. Dieser Befund macht eine einfache Erklärung der FES-Wirkung über unmittelbare Hemmung unwahrscheinlicher, es sei denn, daß aus der Anhäufung der Zitronensäure auf die Möglichkeit geschlossen wird, daß die genannten Säuren auf einem Kurzschlußweg gebildet werden. Als solcher könnte der neuerdings viel erörterte Glyoxylsäurezyklus diskutiert werden, falls er sich unmittelbar an die Zitronensäure anschließen ließe. Es erscheint aber zur Zeit müßig, solche Einzelzusammenhänge näher zu diskutieren, da noch andere Wege der Säureanhäufung an anderen Objekten erörtert werden, unter denen allerdings eine Säurebildung aus Aminosäuren in diesem Falle unwahrscheinlich ist. Die Aminosäureanalyse zeigt keine dahindeutenden Abweichungen. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die auffällige Hemmung des Infektionsvorganges durch FES allein auf deren unmittelbaren fermentinhibierenden Wirkung beruht.

### 4. Schlußbetrachtung

Die vorliegenden Untersuchungen konnten die „Phasenhypothese" auf Grund der Befunde bei Gaswechseluntersuchungen und der Konzentrationsveränderungen im Aminosäurespiegel bestätigen. Sie boten weitere Hinweise für die „dynamischen Vorgänge" in dem Wechselspiel beider Organismen. Bei verschiedenen Gruppen von Inhaltsstoffen ließen sich zum Teil charakteristische Veränderungen aufzeigen, die zu Beginn des Infektionsprozesses zwar vielfach in geringem Umfange auftraten, aber deutlich erkennen ließen, daß durch die pilzliche Infektion der Intermediärstoffwechsel der Pflanze an den verschiedensten Stellen qualitativ und quantitativ verändert wurde. Die Ursache des befallshemmenden Einflusses der verwendeten Hemmstoffe konnte noch nicht im einzelnen analysiert werden, jedoch ergaben sich einige Hinweise auf die möglichen Zusammenhänge zwischen Befallshemmung und Stoffwechseländerung, welche weiterer Untersuchungen wert sind.

### Zusammenfassung

1. Es wurde versucht, durch biochemische Untersuchungen an gesunden und an mit *Puccinia graminis tritici* infizierten Weizenkeimpflanzen weitere Einblicke in das Wechselspiel zwischen Wirt und Parasit zu erhalten.

2. Eine anfällige (Marquis) und eine resistente Weizensorte (Vernal) zeichneten sich durch charakteristische Konzentrationsverschiebungen im Aminosäurespiegel aus, die gleichsinnig in einer Zunahme nach der Infektion verliefen, sich jedoch durch den Zeitpunkt der Anhäufung deutlich unterschieden.

3. Durch Vakuuminfiltration von Thiosemikarbazid, Semikarbazid und Fluoressigsäure in die Blätter wurde vollständige Hemmung des Befalls erzielt, die durch unterschiedliche histologische Bilder gekennzeichnet war. Dies trat auch drei Tage nach der Beimpfung mit unterschiedlicher Stärke ein.

4. Nach Behandlung mit den genannten Substanzen bestand bei den Aminoverbindungen eine auffällige Tendenz zur Anhäufung, während die Zuckerkonzentration in jedem Fall vermindert wurde; die Konzentration der organischen Säuren unterlag keinen gleichsinnig verlaufenden Schwankungen.

5. Die $O_2$-Aufnahme infizierter Blätter wurde durch die Hemmstoffe mehr oder weniger stark verändert. Auffällig war der Einfluß des Thiosemikarbazids, der in Abhängigkeit von Zeitpunkt und Dauer der Behandlung und in einer Hemmung oder Förderung der $O_2$-Aufnahme bestand.

6. In bezug auf die Hemmung der $O_2$-Aufnahme durch Fluoressigsäure und Malonsäure konnte die Bedeutung des Lichtgenusses der Pflanzen durch Variieren der Lichtintensität näher charakterisiert und der Infektionsverlauf in Phasen unterschiedlicher Empfindlichkeit zerlegt werden.

## Summary

### Biochemical investigations on the host-parasite relations using *Puccinia graminis tritici* as an example

1. By means of biochemical investigations of healthy wheat seedlings and seedlings infected with *Puccinia graminis tritici* it was tried to obtain further information about the relations between host and parasite.

2. A susceptible (Marquis) and a resistant (Vernal) wheat variety revealed characteristic changes in the concentration of amino acids which in both cases showed an increase following infection, but with difference in respect to the time at which the maximum was attained.

3. Complete inhibition of disease development was achieved by vacuum infiltration of thiosemicarbazide, semicarbacide and fluoroacetic acid into the leaves; it was characterized by different histological pictures. Infiltration of the disease inhibiting substances at three days after infection resulted also in different degrees of inhibition.

4. After treatment with the above substances there was a striking tendency towards accumulation of the amino compounds whereas the sugar concentration was reduced in every case, the concentration of the organic acids did not show any corresponding alterations.

5. The $O_2$ uptake of infected leaves was altered to a greater or lesser degree by the inhibitory substances. The influence of thiosemicarbazide was notable, consisting in an inhibition or an acceleration of the $O_2$ uptake according to the time and duration of application.

6. In respect to the inhibition of $O_2$ uptake by fluoroacetic acid and malonic acid the importance of light conditions could be more accurately defined by means of varying the light intensity; during the course of disease development, phases of different sensitivity could be distinguished.


## Literaturverzeichnis


ALLEN, P. J., 1954: Physiological aspects of fungus diseases of plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 5, 225—248.

— —, 1959: Metabolic considerations of obligate parasitism. In: Plant Pathol. Probl. and Progr., Madison.

— —, 1959: Physiology and biochemistry of defense. In: J. G. HORSFALL and A. E. DIMOND, Plant Pathol. 1, 435—469.

CHERONIS, N. D., 1954: Micro and semimicro methods. New York.

CHRISTIANSEN-WENIGER, E., 1955: Versuche zur stoffwechselphysiologischen Beeinflussung der Reaktion der Kartoffelknolle auf *Phytophthora infestans* de By. Phytopath. Z. 25, 153—195.

EEGRIWE, E., 1932: Reaktionen und Reagenzien zum Nachweis organischer Verbindungen. I. Z. Anal. Chem. 89, 121.

Farkas, G. L., 1957: Some notes on the metabolic interactions between host and parasite. Act. biol. Acad. Sci. Hung. 7, 315—323.

— —, and Z. Kiraly, 1955: Studies on the respirations of wheat infected with stem rust and powdery mildew. Physiol. Plantarum 8, 877—887.

— —, E. Konrad und Z. Kiraly, 1957: Lichtinduzierte Änderung der Malonatsensitivität der Zellatmung bei Weizen. Naturwissenschaften 44, 65.

Forsyth, F. R., and D. J. Samborski, 1958: The effect of various methods of breaking resistance on stem rust reaction and content of soluble carbohydrate and nitrogen in wheat leaves. Canad. J. Bot. 36, 717—723.

Fuchs, W. H., 1956: Ein Beitrag zur pathologischen Physiologie. Angew. Bot. 30, 141—146.

— —, 1958: Zur Biochemie parasitärer Symbiosen. Angew. Bot. 32, 221—227.

— —, und R. Bauermeister, 1958: Über die Wirkung von Thiosemikarbazid auf die Entwicklung von *Puccinia graminis tritici* auf Weizen. Naturwissenschaften 14, 343—344.

— —, und R. Heitefuss, 1957: Über den Einfluß von Fluoressigsäure auf den Stoffwechsel von Keimpflanzen von *Brassica oleracea*. Naturwissenschaften 44, 333—334.

— —, und R. Siebert, 1959: Über die Sauerstoffaufnahme rostinfizierter Pflanzen. Naturwissenschaften 3, 115—116.

Gassner, G., und W. Franke, 1938: Untersuchungen über den Stickstoffhaushalt rostinfizierter Getreideblätter. Phytopath. Z. 11, 517.

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Basel.

Heitefuss, R., 1957: Erfahrungen zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von organischen Säuren. Angew. Bot. 31, 61.

— —, 1957: Untersuchungen zur pathologischen Physiologie von *Peronospora parasitica* (Gäum.) auf *Brassica oleracea*. Diss. Göttingen.

— —, und W. H. Fuchs, 1960: Untersuchungen zur pathologischen Physiologie von *Peronospora brassicae* (Gäum.) auf *Brassica oleracea*. Phytopath. Z. 37, 348—378.

Kiraly, Z., und G. L. Farkas, 1955: Über die parasitogen induzierte Atmungssteigerung beim Weizen. Naturwissenschaften 42, 213.

Koch, O., und G. Stüttgen, 1950: Klinische und experimentelle Studien zur Thiosemikarbazonwirkung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 210, 409.

Mothes, K., 1940: Zur Biosynthese der Säureamide Asparagin und Glutamin. Planta 30, 726.

Nielsen, J., 1960: Weitere Untersuchungen zur pathologischen Physiologie von *Peronospora parasitica* auf *Brassica oleracea*. Diss. Göttingen.

Noll, A., 1943: Über eine durch Gelbrostinfektion in resistenten Getreidesorten und durch andere Ursachen hervorgerufene wundgummiartige Substanz. Zbl. Bakt. 105, 448.

— —, 1943: Über den Nachweis von Rostmycel im Gewebe der Wirtspflanze. Angew. Bot. 25, 24.

Paech, K., und M. V. Tracey, 1955: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin.

Person, C., D. J. Samborski and F. R. Forsyth, 1958: Effect of Benzimidazole of detached wheat leaves. Nature 180, 1294.

Pohjakallio, O., 1932: Sokerin merkityksestä eräiden ruostesienien ravintoaineena. Act. Agr. Fennica 25, 1—94.

Ravnay, Th., L. Forro und L. Szegö, 1954: Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Thiosemikarbazone. Z. Tuberkulose 104, 249.

Roemer, Th., W. H. Fuchs und K. Isenbeck, 1938: Die Züchtung resistenter Rassen der Kulturpflanzen. Berlin.

Rohringer, R., 1957: Untersuchungen zur Biochemie von Weizenkeimpflanzen nach Infektion mit *Puccinia graminis tritici*, phys. Rasse 126 A. Phytopath. Z. **29**, 45—64.

— —, 1959: Allgemeine Pflanzenpathologie. In Fortschr. Bot. **21**, 361—384.

Rubin, B. A., und E. W. Arzichowskaja, 1953: Biochemische Charakteristik der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Mikroorganismen. Berlin.

Samborski, D. J., F. R. Forsyth and C. Person, 1958: Metabolic changes in detached wheat leaves floated on benzimidazole and the effect of these changes on rust reaction. Canad. J. Bot. **36**, 591—601.

— —, and M. Shaw, 1957: The physiology of host-parasite relations. II. The effect of *Puccinia gram. trit.* on the respiration of the first leaf of resistent and susceptible species of wheat. Canad. J. Bot. **34**, 601—619.

Schwab, G., 1936: Studien über Verbreitung und Bildung der Säureamide in der höheren Pflanze. Planta **25**, 577.

Sempio, C., 1939: Influenza della luce e dell'oscurita sui principali periodi del parassitamento. Riv. Patol. Vegetale **29**, 5.

— —, 1950: Metabolic resistance to plants diseases. Phytopathology **40**, 799—819.

Shannon, L. M., H. R. Young and C. Dudley, 1959: Malonate metabolism by plant tissues. Nature **183**, 683.

Shaw, M., and A. R. Hawkins, 1958: The physiology of host-parasite relations. V. A preliminary examination of the level of free endogenous indoleacetic acid in rusted and mildewed cereal leaves and their ability to decarboxylate exogenously supplied radioactive indoleacetic acid. Canad. J. Bot. **36**, 1—16.

Stakman, E. C., M. N. Levine and W. Q. Loegering, 1944: Identification of physiological races of *Puccinia graminis tritici*. U. S. Dept. Agr. B. E. P. Q. Sect. E. **617**.

Staples, R. C., 1956: The organic acids of the wheat leaf infected with *Puccinia rubigovera trit.* Phytopathology **46**, 27.

Steward, F. C., and J. F. Thompson, 1954: Protein metabolism in plants. In: Neurath, H., and K. Balley, The proteins. New York.

Thimann, K. V., and W. D. Bonner, 1950: Organic acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. **1**, 75.

Tolbert, N. E., and M. S. Cohan, 1953: Products formed from Glycolic acid in Plants. J. Biol. Chem. **204**, 649.

Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Staufer, 1951: Manometric technics and tissue metabolism. Minneapolis.

Uritani, I., and T. Akazawa, 1959: Alteration of the respiration pattern in infected plant. In: J. G. Horsfall and A. Dimond, Plant Pathol. **1**, 394—391.

Waelsch, H., 1952: Certain aspects of intermediary metabolism of glutamine, asparagine and glutathione. Advances in Enzymology **13**, 237.

Walker, J. C., and M. A. Stahmann, 1955: Chemical nature of disease resistance in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **6**, 351—366.

Yemm, E. W., and B. F. Folkes, 1958: The metabolism of amino acids and proteins in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **9**, 245—280.

*From the University Botany Laboratory — Madras 5*

# Gaseous emanation from groundnut infected by *Cercospora personata* (Berk et Curt.) Ell. et Everh.

By

R. N. Swamy

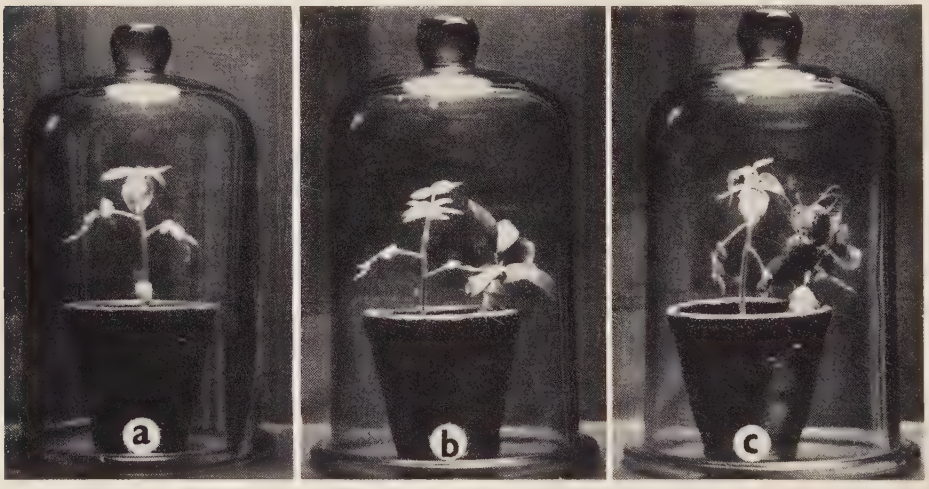
*With one figure*

In the *Cercospora personata* disease of groundnut yellowing of leaves followed by abscission results from heavy foliar infection. In the black spot of rose and the shot hole of cherry this syndrome of a rapid yellow colouration and early abscission of infected leaves, and the diseased leaves producing large quantities of emanations capable of bringing about the triple response in pea seedlings have ben reported (Williamson 1950). It was, therefore, thought worthwhile investigating whether similar volatiles were produced by groundnut leaves infected with *Cercospora personata.*

Three vigorously growing Bonny Best variety tomato plants whose petioles were at an acute angle with the stem on the upper side were selected at the 4-leaf stage. One plant was enclosed under a bell jar with about a dozen heavily infected leaves of groundnut, the petioles of which were dipping in water contained in a vial (Fig. c). A second plant was enclosed under a similar bell jar but with the same number of uninfected groundnut leaves held in a similar manner (Fig. b). The third plant was enclosed under a bell jar without either healthy or infected leaves of groundnut, and served as the control (Fig. a). All the three bell jars were sealed on to glass plates with petroleum jelly to render the system air-tight. The whole set up was placed in a room maintained at 20 °C. After about 36 hours the tomato plant under the bell jar with the infected groundnut leaves showed epinasty of the lowest two leaves (Fig. c) whereas, such changes did not occur on the other two tomato plants, thus demonstrating production of active emanations in the *Cercospora personata*-infected groundnut leaves.

Oranges and grapefruit inoculated with *Penicillium digitatum* and oranges showing stem end decay produced epinasty on test plants sooner than did normal fruit under the same conditions and so did pure cultures of *Penicillium digitatum* (Miller et al., 1940). Using pea seedlings as test material Biale and Shepherd (1941) obtained similar results with the same fungus. The gaseous products of moldy lemon inoculated with *Penicillium*

*digitatum* was found by them to increase the rate of carbon dioxide evolution and to accelerate colour development of sound green lemons. Emanations of a single moldy lemon could produce these effects in 500 fruits. In all these cases and in the experiments of WILLIAMSON (loc. cit.) as well, the volatile product was believed to be ethylene because of the similarity of the responses induced on test material by ethylene and the emanation under study. The emanation from *Penicillium digitatum* has been chemically characterised by HALL (1951) as well as by YOUNG et al. (1951). More recently, DIMOND and WAGGONER (1953) have demonstrated the production of ethylene by tomato plants infected by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* employing both bioassay and chemical methods. According to WILLIAMSON the marked stimulation of ethylene production in certain diseased tissues over comparable healthy tissues is apparently a response to injury. In certain viroses also where active emanations have been reported (ROSS and WILLIAMSON 1951) it appears to be a result of necrosis and is greatest where numerous large necrotic lesions occur.




Effect of emanation from groundnut leaves on tomato plant. (a) Control; (b) Tomato plant with healthy groundnut leaves; (c) Tomato plant with *Cercospora personata* infected groundnut leaves (note the epinasty of the lowest two leaves).

The chemical identity of the emanation from diseased groundnut leaves, now reported, is yet to be determined. It is well known that besides ethylene, other substances like acetylene, propylene, butylene etc. cause epinasty of tomato petioles (KENTEN 1956). But, so far, ethylene is the only unsaturated hydrocarbon known to be produced by plant tissue (see DIMOND and WAGGONER 1953). Thus, the evidence available from literature indicates the strong possibility of the emanation detected in the present investigation being ethylene. If it is indeed ethylene, it, probably, has an important role in the

yellowing and abscission of the leaves associated with the *Cercospora* disease of groundnut.

The author is deeply indebted to Prof. T. S. Sadasivan for encouragement.

## Zusammenfassung

Durch eine einfache Versuchsanordnung (vgl. Abb.) konnte nachgewiesen werden, daß an *Cercospora personata* (Berk. et Curt.) Ell. et Everh. erkrankte Blätter von Erdnuß (*Arachis hypogaea* L.) einen gasförmigen Stoff ausscheiden, welcher an Tomaten Welkesymptome verursacht. Bei diesem Gas handelt es sich wahrscheinlich um Aethylen.

## Summary

Yellowing of leaves followed by abscission in heavy foliar infection of groundnut by *Cercospora personata* reminiscent of black spot of rose and shot hole of cherry was noticed. Experiments in closed environment showed emanation of volatiles by the *Cercospora personata*-infected groundnut leaves as evidenced by epinasty in tomato seedlings. It is to be established that the emanation could be ethylene.

## Literature cited

Biale, J. B., and A. D. Shepherd, 1941: Respiration of *Citrus* fruits in relation to metabolism of fungi. I. Effects of emanations of *Penicillium digitatum* Sacc. on lemons. Amer. J. Botany **28**, 263—270.

Dimond, A. E., and P. E. Waggoner, 1953: The cause of epinastic symptoms in *Fusarium* wilt of tomatoes. Phytopathology **43**, 663—669.

Hall, W. C., 1951: Studies on the origin of ethylene from plant tissues. Bot. Gaz. **113**, 55—65.

Kenten, R. H., 1956: Gasometric analysis in plant investigation in Modern Methods of Plant Analysis. Ed. by K. Paech and M. V. Tracey, Vol. I, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Miller, E. V., J. R. Winston and D. F. Fisher, 1940: Production of epinasty by emanations from normal and decaying *Citrus* fruits and from *Penicillium digitatum*. J. Agr. Research **60**, 269—277.

Ross, A. F., and C. E. Williamson, 1951: Physiologically active emanations from virus-infected plants. Phytopathology **41**, 431—438.

Williamson, C. E., 1950: Ethylene, a metabolic product of diseased or injured plants. Phytopathology **40**, 205—208.

Young, P. E., H. K. Pratt and J. B. Biale, 1951: Identification of ethylene as a volatile product of the fungus *Penicillium digitatum*. Plant Physiol. **26**, 304—310.

*Aus dem Biologischen Institut der Farbenfabriken Bayer AG*

*Leiter: Dr. A. Moenikes*

# Über ein Infektionsverfahren mit *Mycena citricolor*

Von

V. Flück

*Mit einer Abbildung*

## A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der Pilz *Mycena citricolor* (Berk. et Curt.) Sacc. = *Omphalia flavida* (Maubel et Rangel) verursacht in mittel- und südamerikanischen Kaffeepflanzungen des Hochlandes zuweilen empfindliche Schäden.

*Mycena citricolor* ist ein Basidiomycet aus der Reihe der Hymenomyceten (Saccardo 1887) und gehört zur Familie der *Agaricales;* er nimmt innerhalb dieser Familie eine besondere Stellung ein, indem er zwei Fruchtformen bildet. Die Hauptfruchtform sind gestielte Hütchen von 5 bis 20 mm Durchmesser. Sie sind unter natürlichen Verhältnissen nur sehr selten zu finden, da ihre Ausbildung eine lang anhaltende hohe Feuchtigkeit erfordert (Carvajal 1939).

Die Nebenfruchtform besteht aus einem etwa 2 mm langen Stielchen, an dessen Ende ein dem bloßen Auge sichtbares mehr oder weniger rundes Körperchen sitzt. Diese Stielchen werden bei Buller (1934), als „Gemmifers" bezeichnet, die Köpfchen als „Gemmae".

Man findet in der Literatur weitere Bezeichnungen, wie „Stilbum body, cabezuela, cabecita, infection body" (Wellman 1950).

In der sehr ausführlichen Arbeit über *Mycena citricolor* von Sequeira (1952) wird für Stiel und Köpfchen der Ausdruck „stilboids" vorgeschlagen. Der Ausbreitung der Krankheit dienen ausschließlich die Köpfchen, für die wir hier den Ausdruck „Infektionsköperchen" verwenden, analog dem englischen „infection body".

Dennis (1950) nimmt an, daß *Mycena citricolor* im Regenwald höherer Lagen Mittel- und Südamerikas ursprünglich ist. Ein bedeutender Parasit soll der Pilz erst durch die Anpflanzung von Kaffee in diesen Gebieten geworden sein. Die Wahrscheinlichkeit ist gering, daß der Pilz mit dem Kaffee nach Lateinamerika kam; die Nachweise aus afrikanischen Gebieten (Chevalier 1947) und aus Java (Cook 1939) sind umstritten (Sequeira 1952).

Die Ausbreitung der Infektionskörperchen erfolgt durch Regen, unabhängig vom Wind. Sie lösen sich in Gegenwart von Wasser leicht von den Stielchen. Die Oberfläche der Infektionskörperchen ist in nassem Zustand gelatinös, klebrig; sie haften so an der Kleidung, am Gefieder der Vögel, an Insekten und finden auch dadurch Verbreitung. Gelangt ein Infektionskörperchen auf ein Kaffeeblatt, so kommt die Infektion bei genügender Feuchtigkeit nach Wellman (1950) in 6 bis 9 Stunden zum Haften. Die Generalisation der Krankheit erfordert hohe Feuchtigkeit über größere Zeitspannen. Diese Forderung ist gegeben in beschatteten Kaffeepflanzungen in höheren Lagen bei Temperaturen von 18 bis 24 °C. Gelegentlich einer Reise nach Süd- und Mittelamerika konnte beobachtet werden, daß nun die Tendenz zu schattenlosen Kaffeepflanzungen besteht, die tatsächlich geringeren Befall durch *Mycena citricolor* aufweisen.

Der Pilz verursacht auf den Blättern runde bis leicht ovale Läsionen von 0,5 bis 10 mm Durchmesser. Diese Läsionen sind im Frühstadium dunkelbraun und werden später hellbraun bis schmutzigweiß. Im Zentrum jüngerer Läsionen ist das Infektionskörperchen meist gut erkennbar. Neben den Blättern werden auch Zweige und Beeren des Kaffeestrauches vom Pilz befallen. Werden Kaffeeblätter, die Läsionen aufweisen, innerhalb von 3 bis 4 Tagen in 100 % rel. Luftfeuchte gebracht, so beginnen sich auf und am Rande der Läsionen, meist blattoberseits, die Nebenfruchtformen auszubilden. Nach 8 bis 10 Tagen sind die zitronengelben Infektionskörperchen dem bloßen Auge gut sichtbar.

Die Schädigung des Kaffeestrauches durch *Mycena citricolor* erfolgt durch frühzeitigen Blattfall, Verringerung der assimilierenden Blattfläche bei oft bis zu hundert Läsionen je Blatt, Abfallen der unreifen Kaffeebeeren und Verkümmerung junger Zweige. Ein völliges Absterben des Strauches erfolgt jedoch nie. Der Pilz besitzt ein beachtlich großes Wirtsspektrum. Sequeira (1952) nennt 150 verschiedene Wirtspflanzen aus 45 Familien und glaubt, daß diese Liste noch nicht endgültig ist.

Als weitere Kulturen neben Kaffee werden Kakao, *Citrus* und der Chinarindenbaum befallen, ernstlich jedoch nur dann, wenn die Voraussetzungen, wie Beschattung der Kulturen, hohe Feuchtigkeit und entsprechende Temperaturen (18 bis 24 °C) gegeben sind.

Unsere ersten Infektionsversuche mit dem Pilz erfolgten bei der Buntnessel (*Coleus hybr.*). Beschreibungen über Infektionsmethoden liegen bereits vor bei Wellman (1950) und Sequeira (1952). Da die „Sporen" des Pilzes,

die Infektionskörperchen, für das bloße Auge gut sichtbar sind und sich mit einer Öse leicht handhaben lassen, ermöglichen sie eine gezielte Infektion des Blattes.

Die Buntnessel fand in physiologischen Untersuchungen oft Verwendung, z. B. bei Wuchsstoffuntersuchungen (FISCHNICH 1935, LAIBACH 1957). Sie schien uns auch geeignet als Testobjekt für systemische Fungizide gegen blattparasitäre Pilze, da die Pflanze ein gutes Translokationsvermögen und keine Wachskutikula besitzt.

Wir stellten uns die Aufgabe, ein Infektionsverfahren zu entwickeln, das eine möglichst hohe Infektionsrate mit geringer Streuung unter europäischen Verhältnissen gewährleistet und jederzeit reproduzierbar ist.

Die Versuchsfragen lauteten:

1. Unter welchen Bedingungen können wir über das ganze Jahr ausreichend infektionstüchtige Infektionskörperchen produzieren?
2. Mit welchen Methoden gelingt es, über das ganze Jahr *Coleus hybr.* bzw. *Coffea arabica* mit *Mycena citricolor* unter Labor- bzw. Gewächshausbedingungen zu infizieren?

## B. METHODEN

### 1. Die Anzucht des Infektionsmaterials

Der von uns verwendete Stamm von *Mycena citricolor* wurde in Kolumbien von Kaffeeblättern isoliert und uns von Herrn Dr. O. URHAN, Bogotà, freundlicherweise überlassen, wofür wir hier bestens danken.

In Vorversuchen stellten wir fest, daß der Pilz auf Kartoffeldekoktagar, dem 2 % Glukose beigemischt wurden, gut wächst und ausreichend Infektionskörperchen bildet; dabei erfolgte ein besseres Wachstum in 100-ml-Erlenmeyerkolben als in Petrischalen, vor allem war die Ausbildung der Infektionskörperchen homogener. Das Wachstum des Pilzes verschlechterte sich jedoch mit zunehmendem Alter der Lagerkartoffeln, aus denen wir das Dekokt herstellten. So war es erforderlich, einen synthetischen Nährboden zu finden, auf dem der Pilz über das ganze Jahr gleichmäßig und ausreichend Infektionskörperchen produziert.

SEQUEIRA (1952) erwähnt, daß *Mycena citricolor* am besten auf Kartoffeldekoktagar von pH 4,3 gedeiht. Wir verglichen nun Wachstum und Bildung von Infektionskörperchen auf den Agarnährmedien A und B mit denjenigen auf Kartoffeldekoktagar. Das pH wurde jeweils bei allen Nährböden einmal auf 4,3 und einmal auf 5,6 eingestellt; pH 5,6 entspricht einem frisch hergestellten Kartoffeldekoktagar mit 2 % Rohrzucker.

Agar A:

| | |
|---|---|
| 2 | g Stärke, wasserlöslich |
| 9,2 | g Pepton |
| 6,8 | g $KH_2PO_4$ |
| 2,5 | g $MgSO_4$ |
| 0,6 | ml $FeCl_2$ (1%ige Lösung) |
| 100 | $\gamma$ Aneurin |
| 100 | $\gamma$ Riboflavin |
| 100 | $\gamma$ Pyridoxin Hydrochlorid |
| 100 | $\gamma$ Pantothensäure |
| 0,1 | g Calziumnitrat |
| 20 | g Agar-Agar |
| 1000 | ml Aqua dest. |

Agar B:

| | |
|---|---|
| 40 | g Maltose |
| 1,2 | g Asparagin |
| 1,5 | g $KH_2PO_4$ |
| 0,5 | g $MgSO_4$ |
| 0,6 | ml $FeCl_3$ (1%ige Lösung) |
| 250 | $\gamma$ Aneurin |
| 5 | $\gamma$ Indolylessigsäure |
| 50 | $\gamma$ Tryptophan |
| 20 | g Agar-Agar |
| 1000 | ml Aqua dest. |

In Tabelle 1 kommt zum Ausdruck:

1. die Unterschiede im Wachstum der Kulturen auf Kartoffeldekoktagar und Agar B bei pH 5,6 sind gering;
2. das pH hat im Bereich von 4,4 bis 5,6 keinen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum auf festen Nährböden, pH 4,4 wirkt etwas wachstumsverzögernd;
3. durch die Anzucht im Dunkeln entstehen keine Infektionskörperchen auf den geprüften Nährböden.

Die Ausbildung von Infektionskörperchen erfolgt nur unter Einfluß von Licht. Bei den Kulturen, die 8 Tage am Licht standen, bilden sich Infektionskörperchen mit zunehmendem Alter der Kultur vom Impfstück ausgehend sukzessive bis zum Rand hin. Damit haben wir aber Infektionskörperchen von sehr unterschiedlichem Alter, was sich für die spätere Infektionstüchtigkeit nachteilig auswirken mag.

Wir stellten nun 8 und 15 Tage im Dunkeln bei 24 °C gewachsene Kulturen ans Licht. Als Lichtquelle diente ein Philips HPL 400-W-Lampe vom Typ 57221, die etwa 60 cm über den Kulturen angebracht wurde. Beobachtungen erfolgten nach 10 bis 15 Tagen. Als Vergleich dienten Kulturen, die dauernd am Licht standen (s. Tab. 2).

Aus Tabelle 2 ist folgendes ersichtlich:

1. es erfolgt eine homogenere Bildung der Infektionskörperchen, wenn die Kulturen erst im Dunkeln wachsen und dann ans Licht gestellt werden.
2. Auf Kartoffeldekoktagar bilden sich die meisten Infektionskörperchen. Auf Agar B ist der Rasen der Infektionskörperchen nicht ganz so dicht, jedoch über die ganze Kulturfläche regelmäßig verteilt, kommt also dem Kartoffeldekoktagar am nächsten.

*Tabelle 1*

Wachstum von *Mycena citricolor* (Berk. et Curt.) auf verschiedenen Nährböden bei pH 5,6 bzw. 4,4 unter Einfluß von Licht bzw. Dunkel und 24 °C (100-ml-Erlenmeyerkolben mit je 25 ml Nähragar; Durchmesser des Nährbodens 50 mm)

| Nährböden | Wachstum in Millimeter | | | | Bemerkungen über Beginn der Bildung von Infektionskörperchen |
|---|---|---|---|---|---|
| | unter Licht | | im Dunkeln | | |
| | 2 Tage | 5 Tage | 2 Tage | 5 Tage | |
| Kartoffeldekokt pH 4,4 | 18,0 | 40,7 | 18,8 | 38,4 | Bei Kulturen am Licht Infektionskörperchen im Umkreis von etwa 15 mm um das Impfstück ausgebildet. Kein Unterschied zu pH 5,6 am Licht. Bei Kulturen im Dunkeln keine Infektionskörperchen |
| Kartoffeldekokt pH 5,6 | 19,7 | **48,7** | 20,1 | **45,5** | Bei Kulturen am Licht Infektionskörperchen im Umkreis von 15 mm um das Impfstück ausgebildet. Kein Unterschied zu pH 4,4 am Licht. Bei Kulturen im Dunkeln noch keine Infektionskörperchen |
| Agar A pH 4,4 | 16,9 | 38,4 | 18,4 | 40,5 | Um das Impfstück beginnen sich Infektionskörperchen zu bilden, jedoch noch keine ausgebildet. Bei Kulturen im Dunkeln keine Anlagen zu Infektionskörperchen |
| Agar A pH 5,6 | 18,2 | 40,1 | 20,0 | 41,5 | Um das Impfstück beginnen sich Infektionskörperchen zu bilden. Bei Kulturen im Dunkeln keine Anlagen zu Infektionskörperchen |
| Agar B pH 4,4 | Agar verfestigt sich nicht | | | | — |
| Agar B pH 5,6 | 18,7 | **47,1** | 19 | **44,5** | Bei Kulturen am Licht Infektionskörperchen im Umkreis von 25 mm um das Impfstück zum Teil ausgebildet, jedoch nicht so dicht wie bei Kartoffeldekoktkulturen am Licht. Bei Kulturen im Dunkeln keine Anlagen zu Infektionskörperchen |

3. Die günstigsten Bedingungen für die Bildung der Infektionskörperchen sind: Anzucht bei 20 bis 24 °C im Dunkeln während 8 bis 10 Tagen und darauffolgender Lichteinfluß während 10 bis 15 Tagen. Die Kulturen bei 20 °C weisen eine gleichmäßigere Myzelfläche auf und ergeben gleichmäßiger verteilte Infektionskörperchen.

Eine dauernde künstliche Belichtung während 10 bis 15 Tagen ist nicht unbedingt erforderlich. Stellt man die Kulturen im Gewächshaus bei 22 bis 24 °C auf, so sind nach etwa 24 bis 30 Tagen ebenfalls ausreichend Infektionskörperchen gebildet.

*Tabelle 2*

Die Bildung von Infektionskörperchen auf verschiedenen Nährböden unter Einfluß von Licht

Lichtquelle Philips HPL 400 W

| Kulturbedingung bei 24 °C | Nährböden pH 5,6 | Bemerkungen über Bildung von Infektionskörperchen |
|---|---|---|
| Dunkel während 8 Tagen, dann am Licht während 15 Tagen | Kartoffeldekoktagar | Dichter Rasen von Infektionskörperchen über die ganze Kulturfläche, Farbe der Infektionskörperchen sattgelb |
| | Agar A | Nur vereinzelte ausgebildete Infektionskörperchen oder Anlagen dafür vorhanden |
| | Agar B | Infektionskörperchen nicht so dicht wie bei Kartoffeldekoktagar, jedoch über die ganze Kulturfläche gleichmäßig vorhanden. Einzelne Infektionskörperchen etwas größer als bei Kartoffeldekoktagar |
| Dunkel während 15 Tagen, dann am Licht während 10 Tagen | Kartoffeldekoktagar | Rasen der Infektionskörperchen nicht so dicht und sattgelb wie bei Kulturen, die nur 8 Tage im Dunkeln standen |
| | Agar A | Keine Infektionskörperchen, nur Anlagen zu deren Bildung vorhanden |
| | Agar B | Geringe Bildung von Infektionskörperchen, unregelmäßig über den Myzelrasen verteilt (Saltationen) |
| Dauernd am Licht während 25 Tagen | Kartoffeldekoktagar | Dichter Rasen von Infektionskörperchen über die ganze Kulturfläche. Farbe gelbbraun. Infektionskörperchen bildeten sich laufend mit zunehmendem Kulturdurchmesser, daher unterschiedliches Alter |
| | Agar A | Infektionskörperchen weniger dicht als bei Kartoffeldekoktagar. Farbe gelbbraun |
| | Agar B | Infektionskörperchen sehr dicht im Umkreis von 25 mm um das Impfstück, zum Kulturrand hin weniger dicht, Farbe gelbbraun |

## 2. Die Infektionstechnik

Nachdem wir festgestellt hatten, daß unter unseren Bedingungen ausreichend Infektionskörperchen auf Kartoffeldekoktagar-Kulturen bzw. Agar-B-Kulturen gebildet wurden, galt es nun, deren Infektionstüchtigkeit zu erproben.

Zu Beginn unserer Untersuchungen brachten wir die Infektionskörperchen mit einem Dachshaarpinsel auf die Blattoberfläche, oder wir sprühten eine Aufschwemmung von Infektionskörperchen auf das Blatt. Die Pflanzen wurden bei 100 % rel. Luftfeuchte in Feuchtkammern gehalten, oder die abgetrennten und infizierten Blätter wurden in Feuchtschalen gelegt. Bei *Coleus* konnte nach 4 bis 5 Tagen, bei Kaffee nach 6 bis 8 Tagen ausgewertet werden.

Wir legten folgendes Bonitierungsschema zugrunde:

| | | |
|---|---|---|
| Läsion | 0 mm ⌀ | Befallsgrad 0 |
| Läsion | 1 bis 2 mm ⌀ | Befallsgrad 1 |
| Läsion | 2 bis 3 mm ⌀ | Befallsgrad 2 |
| Läsion | 3 bis 4 mm ⌀ | Befallsgrad 3 |
| Läsion | 4 und mehr mm ⌀ | Befallsgrad 4 |

In beiden Fällen kam es zu Läsionen sowohl auf *Coleus*- als auch auf Kaffeeblättern. In beiden Fällen war aber die Streuung so groß, daß sie keine exakte statistische Auswertung erlaubte.

Um die Streuung herabzusetzen, versuchten wir, jedes Blatt mit einer bestimmten Anzahl Infektionskörperchen zu infizieren. Dies ist leicht möglich, weil die Infektionskörperchen auch mit bloßem Auge sichtbar sind. Wir brachten nun auf wassergesättigte Papierringe (Durchmesser außen etwa 20 mm, innen etwa 5 mm) aus dünnem Filterpapier (Schleicher und Schüll „Ederol" Filterpapier AA Krepp) 15 bis 30 Infektionskörperchen. Diese Zahl ergab sich aus vielen Versuchen, die zeigten, daß dann je Ring im Mittel etwa 5 bis 8 Läsionen erfolgten. Die Infektionskörperchen wurden mit einer in Wasser getauchten Öse den Kulturen in 100-ccm-Erlenmeyerkolben entnommen. Je Blatt legten wir zwei Papierringe mit Infektionskörperchen entlang der Mittelrippe auf, so daß die Körperchen zwischen Blattoberfläche und Papierring lagen. Die Verwendung der Papierringe erwies sich als ausschlaggebend. Wir vermuten, daß durch das Papier besonders günstige Feuchtigkeitsverhältnisse geschaffen werden; außerdem werden die Infektionskörperchen beim Besprühen der Blätter mit Wasser nicht weggeschwemmt; das Besprühen ist aber zur längeren Feuchthaltung erforderlich. Filterpapier mit Riffelung erwies sich dabei als deutlich vorteilhafter gegenüber Papier mit glatter Oberfläche.

Infizierte *Coleus*- bzw. Kaffeeblätter. Ein Papierring ist jeweils zur Sichtbarmachung der Läsionen entfernt worden. Photo: Gertrud Wehn

Wir versuchten, schwarze Papiersorten zu verwenden, weil die gelben Infektionskörperchen darauf besonders gut zu sehen waren. Es kam dabei aber zu Keimhemmungen, die wir dem Papierfarbstoff zuschrieben.

Die infizierten *Coleus*- oder Kaffeeblätter, abgetrennt oder an der Pflanze, kommen dann unter Feuchtglocken oder in eine Feuchtkammer bei 18 bis 21 °C. Die Papierringe müssen feucht bleiben, wenn nötig, durch zusätzliches Ansprühen mit Wasser. Nach 4 bis 6 Tagen können Infektionsversuche mit *Coleus*, nach 6 bis 8 Tagen solche mit Kaffee ausgewertet werden. *Coleus* läßt sich etwas leichter und mit weniger Streuung infizieren als Kaffee. Wir glauben, beobachtet zu haben, daß vor allem Kaffeeblätter, die der Sonne ausgesetzt waren, sich schwerer infizieren lassen. Es lassen sich auch nur jüngere Kaffeeblätter infizieren, die noch typisch weich sind. Es ist dabei kein Unterschied im Infektionserfolg zwischen *Coleus*- oder Kaffeeblättern an der Pflanze unter Feuchtglocken oder in Feuchtkammern und abgetrennten Blättern in Feuchtschalen festzustellen. Ausschlaggebend sind 18 bis 21 °C und 100 % rel. Feuchte.

Für die Berechnung des Krankheitsindexes wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die Befallsstellen bzw. Läsionen je Pflanze (bei *Coleus* z. B. von je 4 Blättern mit je zwei Papierringen) wurden je nach Befallsgrad 1 bis 4 erfaßt.

Von der unbehandelten Kontrolle wurde nun erst ein Mittelwert der Befallsstellen errechnet nach der Formel:

$$\text{Mittelwert der Kontrolle M} = \frac{\text{Summe der Befallsstellen}}{\text{Anzahl der beteiligten Pflanzen}}$$

Lag nun die Zahl der Befallsstellen einer behandelten Pflanze unter dem Mittelwert der Kontrolle, so wurden sie bis zu diesem Mittelwert ergänzt mit dem Bonitierungsgrad 0.

Die Modifikation wurde unter der Annahme getroffen, daß bei einer behandelten Pflanze mit weniger Befallsstellen gegenüber „Unbehandelt" entsprechende Nichtkeimung der Infektionskörperchen erfolgte.

Durch diese Annahme wurde in der folgenden Berechnung des Krankheitsindexes

$$K = \frac{\text{Summe aus (Befallsgrad} \times \text{Anzahl der Läsionen)} \times 100}{\text{Summe der ausgewerteten Läsionen}}$$

die Summe der ausgewerteten Läsionen, wo weniger Befallsstellen vorlagen, auf den Mittelwert der Kontrolle bezogen. Wo gleichviel oder mehr Läsionen als beim Mittelwert der Kontrolle vorlagen, wurden diese direkt als „Summe der ausgewerteten Läsionen" eingesetzt.

Wird der Mittelwert der Kontrolle bei behandelten Pflanzen mit weniger Läsionen nicht berücksichtigt, so können durch weit weniger Befallsstellen als bei der Kontrolle hohe Quotienten entstehen, weil der Divisor (Summe der Läsionen) klein ist.

Die angewandte Modifikation ist einmal bedingt durch die etwas unterschiedliche Anzahl von Infektionskörperchen je Papierring, von denen wiederum nur etwa 50 % tatsächlich Läsionen verursachen.

Aus diesen schwer unter exakte Kontrolle zu bekommenden Faktoren wird dem Testverfahren stets eine große Streuung anhaften, die aber bei sorgfältiger Durchführung unter 20 % bleibt.

Meinen Mitarbeitern, Fräulein IRENE BABKA, Fräulein RENATE GRATHWOHL und Herrn STEPHAN OTTEN, danke ich hier bestens für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

## Zusammenfassung

1. Es wurden Versuche unternommen, den Pilz *Mycena citricolor* auf einem synthetischen Nährboden zu kultivieren, wobei ausreichend Nebenfruchtformen (Infektionskörperchen) gebildet werden sollten. Dies wurde erreicht durch Anzucht des Pilzes im Dunkeln bei 20 bis 24 °C während 7 bis 10 Tagen auf dem hier beschriebenen Agar B (pH 5,6) und anschließender Belichtung der Kulturen während 10 bis 15 Tagen, z. B. durch eine Philips HPL 400-W-Lampe, Typ 57221. Die Lichtquelle wurde in etwa 60 cm Abstand über den Kulturen angebracht. Die Anzucht erfolgt am besten in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit je 25 ml Nähragar. Zum Vergleich dienten Kulturen auf Kartoffeldekoktagar + 2 % Glukose.

2. Das pH des festen Nährbodens hat keinen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum des Pilzes und die Ausbildung der Infektionskörperchen.

3. Wir versuchten, unter Gewächshausbedingungen eine Infektionsmethode zu entwickeln, die bei der Buntnessel und bei Kaffeepflanzen einen möglichst gleichmäßigen und befriedigend hohen Befall erzielt.

4. Es wurden abgetrennte Blätter und Blätter an den Pflanzen mit gleich gutem Erfolg infiziert. Von größter Bedeutung ist das Einhalten von 100 % rel. Luftfeuchte und 18 bis 21 °C während der Inkubationszeit.

5. Die Auswertung der Läsionen erfolgte bei *Coleus* nach 4 bis 6 Tagen, bei Kaffee nach 6 bis 8 Tagen.

6. Die Berechnung des Krankheitsindexes wird beschrieben.

## Summary

1. Experiments were carried out on the cultivation of the fungus *Mycena citricolor* in synthetic nutrient medium in order to obtain sufficient infection material, (infection bodies). These infection bodies were formed by cultivating *Mycena citricolor* in the dark at 20 to 25 °C. within 7 to 10 days on the before mentioned Agar B (pH 5.6) and then exposing them to light for 10 to 15 days, e. g. by means of Philips HPL 400-W-light, type 57221. The

light was installed about 60 cm above the cultures. Cultivation is preferably carried out in 100-ml-Erlenmeyer flasks each containing 25 ml of nutrient medium (agar). In comparison cultures on potato-decoction-agar + 2 % glucose were used.

2. The pH of solid nutrient medium does not show substantial influence on growth of the fungus and the development of infection bodies.

3. We tried to find a method of infection under greenhouse conditions, resulting in a satisfactorily high and regular infestation of *Coleus* and coffee-plants. For this purpose we used 15 to 30 infection bodies put on a paper ring made from filter paper (Schleicher und Schüll „Ederol" Filterpapier AA, Krepp), showing an outside diameter of about 20 mm and an inside one of about 5 mm. These rings were put on the leaves to be infected in such a manner that the infection bodies were placed between the leaf and the paper. The paper rings were saturated with water, if necessary, moistened by spraying water during incubation period.

4. We infected plant leaves and those detached from plants, both methods showing best results. It is of utmost importance to care for 100 % of relative atmospheric humidity as well as for a temperature of 18 to 21 °C during incubation period.

5. Evaluation of lesions was carried out after 4 to 6 days on *Coleus* and after 6 to 8 days on coffee.

6. Calculation method of disease index is described.

## Literaturverzeichnis


Buller, A. H. R., 1934: Researches of fungi. London, Longmans, Green & Co., v. 6, p. p. 397—443.

Carvajal, B. F., 1939: Ojo de gallo (*Omphalia flavida*). Revista del Instituto de Defensa del Café de Costa Rica, 7, 535—576.

Chevalier, A., 1947: Les caféiers du globe. III. Enc. Biol. 28, 357 S. Lechevalier, Paris.

Cook, M. T., 1939: Enfermedades de las plantas economicas de las Antillas. Trad. de J. Z. Otero, Universidad de Puerto Rico, Rio Piedras, Puerto Rico, 530 S.

Dennis, R. W. G., 1950: An earlier name for *Omphalia flavida* Maublanc and Rangel. Kew Bull. 3, 434.

Fischnich, O., 1935: Über den Einfluß von β-Indolylessigsäure auf die Blattbewegungen und die Adventivwurzelbildung von *Coleus*. Planta 24, 552.

Laibach, F., 1957: Der Einfluß von Auxin und Gibberellin auf die Abstoßung von Pflanzenorganen. Naturwissenschaften 44 (22), 594—595.

Saccardo, P. A., 1887: Silloge fungorum 5, 263, 308.

Sequeira, L., 1952: Studies on *Omphalia flavida*, the agent of the American leaf spot disease of coffee. Ph. D. Thesis, Harvard University.

Wellman, F. L., 1950: Dissemination of *Omphalia* leaf spot of coffee. „Turrialba", Vol. I, 1, p. p. 12—27.

*Aus dem Institut für Phytopathologie und Mikrobiologie*
*der Universität Pretoria*
*Direktor: Prof. Dr. P. M. Le Roux*

# Untersuchungen über *Guignardia citricarpa* Kiely, den Erreger der Schwarzfleckenkrankheit auf *Citrus*

Von

H. Schüepp

*Mit 7 Abbildungen*

Inhalt: Einleitung. — 1. Historischer Überblick. — 2. Krankheitssymptome und Lebenszyklus des Pilzes. — 3. Morphologie und systematische Stellung des Krankheitserregers. — 4. Versuche mit Reinkulturen a) Isolation und Wachstum; b) Verhalten in bezug auf Licht und pH. — 5. Infektionsversuche. — 6. Bekämpfungsmöglichkeiten. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

## EINLEITUNG

Die Nebenfruchtform von *Guignardia citricarpa* Kiely, beschrieben als *Phoma citricarpa* McAlp., verursacht auf den Schalen von *Citrus*-Früchten Flecke von verschiedener Gestalt und Größe. Die Krankheit ist unter dem Namen „Black-Spot-Disease" (Schwarzfleckenkrankheit) bekannt. Die befallenen Früchte sind unansehnlich und deshalb nicht marktgängig; zudem dienen die Flecke als Eintrittspforten für verschiedene Fäulnis erregende Mikroorganismen, welche die Haltbarkeit befallener Früchte beträchtlich verringern.

Die Schwarzfleckenkrankheit breitete sich in den vergangenen Jahrzehnten auf verschiedene *Citrus*-Anbaugebiete aus und bewirkte in gewissen Gegenden gewaltige Ertragsausfälle. Vielerorts muß *Guignardia citricarpa* als gefährlichster Krankheitserreger auf Agrumen betrachtet werden. Über den schwerwiegenden, durch die genannte Epidemie verursachten Schaden berichteten verschiedene Autoren wie McCleery (1939), Kiely (1948, 1957), Wager (1950), Loest (1958) und Fochessatti (1959).

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse aus Untersuchungen über das Verhalten des Krankheitserregers in Reinkultur und über dessen Lebenszyklus diskutiert. Ich möchte an dieser Stelle der Regierung der Südafrikanischen Union wie auch der Universität von Pretoria für die freundliche Ein-

ladung und die gastliche Aufnahme herzlich danken. Vielen Dank schulde ich der Kommission des schweizerischen Nationalfonds, die mir durch ein Stipendium die Reise und den Studienaufenthalt in Südafrika ermöglichte. Ein besonderes Dankeswort richtet sich an die „Crocodile-Valley-Citrus-Estates" in Nelspruit, deren finanzieller Beitrag die Arbeiten weiterführen und ergänzen ließ.

## 1. Historischer Überblick

Die Krankheit wurde erstmals 1895 in Australien von Benson beschrieben und „Black Spot of the Orange" genannt. Nach seinem Bericht war die Epidemie damals in verschiedenen Distrikten Australiens bekannt und verursachte auch schon bedeutenden Schaden. Der Erreger der in New South Wales weit verbreiteten Schwarzfleckenkrankheit wurde von McAlpine (1899) näher untersucht und als *Phoma citricarpa* McAlp. beschrieben.

Bis 1920 war *Phoma citricarpa* nur aus Australien bekannt. Dann griff die Krankheit auf *Citrus*-Anbaugebiete folgender Länder über: China, Indien, Japan, Formosa, Argentinien, Brasilien, Java, Rußland und Südafrika (Fawcett 1936, Kiely 1948).

In Südafrika wurden von *Phoma citricarpa* hervorgerufene Flecke zum erstenmal von Doidge (1929) in Pietermaritzburg festgestellt. Die Epidemie dehnte sich besonders in den letzten 15 Jahren weiter aus und wurde in zahlreichen Gebieten Südafrikas zu einem bedeutenden phytopathologischen Problem. Die Ausbreitung der Krankheit in Südafrika wurde von Wager (1952) eingehend erforscht und mit genauen Daten ausführlich dargestellt.

## 2. Krankheitssymptome und Lebenszyklus des Pilzes

Lange Zeit war nur die Nebenfruchtform des Erregers, *Phoma citricarpa* McAlp., bekannt. Kiely fand 1948 auf abgestorbenen Blättern von *Citrus*-Bäumen sehr zahlreich vorhandene Fruchtkörper eines Ascomyceten, den er in Kulturversuchen als identisch mit *Phoma citricarpa* erkannte und als neue Art, *Guignardia citricarpa* Kiely, beschrieb. Die asexuelle Fruchtform entwickelt sich parasitisch und saprophytisch, während sich die sexuelle Reproduktion nur auf abgestorbenem Material vollzieht. Die Krankheitssymptome zeigen sich im Zusammenhang mit der Bildung der Konidienform des Pilzes.

Die Pyknidien entwickeln sich sowohl parasitisch auf Früchten und lebenden, alternden Blättern wie auch saprophytisch auf abgestorbenen Blättern und hie und da auf toten Zweigen. Als erste Stadien in der Entwicklung der Krankheitssymptome auf den Früchten bilden sich je nach *Citrus*-Art braune, gelbe bis leuchtend orange Flecke. Diese nehmen entsprechend dem Reifezustand der Früchte und den Umweltbedingungen verschiedene Form und Ausdehnung an. Im Zentrum der Flecke reifen oft die kleinen kugeligen, schwarzen Pyknidien heran. Es können drei Fleckentypen unterschieden werden, die besonders von Kiely (1948, 1949) ausführlich charakterisiert wurden.

Die sogenannten „Hartflecke“ (Abb. 1) bilden sich oft schon, bevor die Früchte heranreifen, sind meist einzeln, besitzen Durchmesser von 1 bis 4 mm und sinken schalenförmig ein. In der Mitte bilden sich eine bis mehrere Pyknidien, und meist ist der Fleck von einem grün verfärbten Ring umgeben. Die Krankheit breitet sich von „Hartflecken“ nicht direkt weiter aus. Bei Grapefruit tritt oft Harz aus den Flecken, und die Bildung der Pyknidien wird unterdrückt.

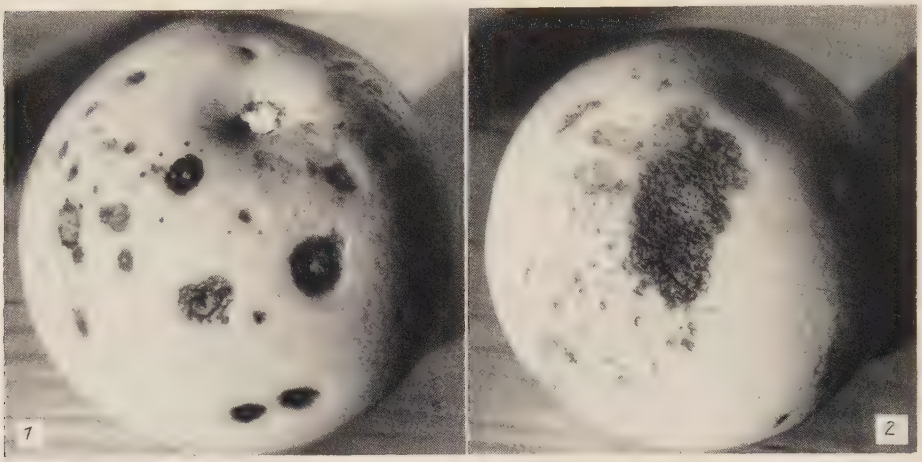



Abb. 1. Befallsbild von *Guignardia citricarpa* Kiely auf Grapefruit: „Harte Flecke“, zum Teil von sekundären, fäulniserregenden Mikroorganismen besiedelt. ½ nat. Gr.
Abb. 2. Befallsbild von *Guignardia citricarpa* Kiely auf Grapefruit: „Virulenter Fleck“ im Zentrum, darum herum „gesprenkelte Flecke“. ½ nat. Gr.

Ein zweites Krankheitssymptom stellen die „gesprenkelten Flecke“ (Abb. 2) dar. Diese entstehen miteinander in großer Zahl und bedecken meist ganze Rindenpartien, sie variieren in der Farbe von braungelb, orange bis rotbraun, werden in kurzer Zeit 3 bis 4 mm groß, fließen oft zusammen und verunstalten die Früchte in wenigen Tagen beträchtlich.

Eine dritte Erscheinung sind die „virulenten Flecke“ (Abb. 2 und 3). Es bilden sich, wenn die Früchte völlig reif sind, braune, große, die Schale bis zur Hälfte bedeckende und tief ins Albido (Mesokarp) eindringende, die Früchte deformierende Flecke. Früchte in diesem Krankheitsstadium fallen bald vom Baum und sind in hohem Maße für Fäulniskrankheiten anfällig. Die rasche und umfangreiche Ausbreitung des die „virulenten Flecke“ verursachenden Pilzmyzels wird erst im völlig reifen Rindengewebe möglich und besonders durch die Schwächung der Rindenzellen bei starker Sonnenbestrahlung begünstigt. Die von „virulenten Flecken“ umschlossenen „Hartflecke“ und „gesprenkelten Flecke“ bleiben deutlich sichtbar und ragen, von einem braunen Ring umgeben, als kleine Inseln heraus.

Flecke mit Pyknidien bilden sich oft auf lebenden, reifen, meist über ein Jahr alten Blättern. Das Ausmaß des Befalles der Blätter ist nicht pro-

portional zu dem der Früchte. Oft sind die Früchte eines Baumes stark befallen, während die Blätter nur vereinzelt Flecke aufweisen und umgekehrt. Besonders häufig werden die Krankheitssymptome auf Zitronenblättern gebildet. Die Blattflecke sind 1 bis 3 mm groß, eingesenkt, von einem bräunlichen bis dunkelbraunen Ring umgeben, und meist verfärben sich die Gewebepartien um den Fleck herum. Die Pyknidien entstehen in der Mitte der Flecke; sie werden jedoch nicht in allen Fällen gebildet. Auf den abgefallenen Blättern entwickeln sie sich bei genügender Feuchtigkeit schon nach wenigen Tagen in riesiger Zahl. Auf abgestorbenen Zweigen bilden sich die Pyknidien ebenfalls bei günstigen Feuchtigkeitsbedingungen, zum Beispiel, wenn abgeschnittene Äste am Rande der Pflanzungen aufgeschichtet und später von Gras und Gebüsch überwachsen werden.

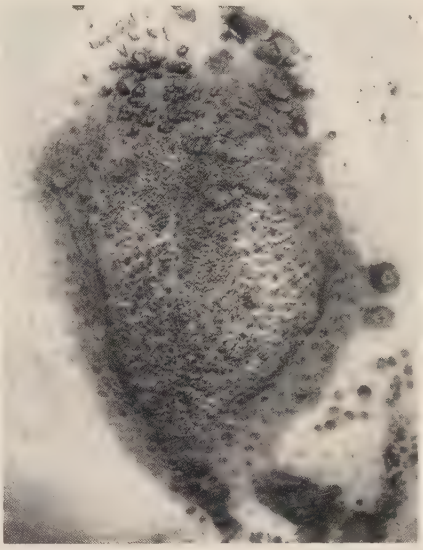


Abb. 3. Befallsbild von *Guignardia citricarpa* Kiely auf Grapefruit: „Virulenter Fleck", rechts außen Mitte zwei „harte Flecke". Vergr. 2×

Die Hauptfruchtform, *Guignardia citricarpa*, entwickelt sich bei günstigen Witterungsbedingungen auf alten, vermodernden Blättern unter den Bäumen. Die Fruchtkörper können auf einem einzelnen Blatt zu Tausenden gebildet werden. Seltener läßt sich die sexuelle Form auch auf toten verrottenden Zweigen finden. Die Morphologie des Pilzes soll im folgenden Kapitel besprochen werden.

### 3. Morphologie und systematische Stellung des Krankheitserregers

*Guignardia citricarpa* Kiely
Proc. Linn. Soc. N.S.W. 73, 249—292 (1948)

Nebenfruchtform beschrieben als:

*Phoma citricarpa* McAlp. — The Fungus Diseases of *Citrus* Trees in Australia 20—22, Melbourne (1899).

Nährpflanzen: *Citrus* spp.

Die kugeligen oder leicht niedergedrückten, 130 bis 150 $\mu$ großen Perithecien werden subepidermal auf alten vermodernden *Citrus*-Blättern gebildet. Es ist kein Stroma vorhanden. Das Wirtssubstrat ist von derbwandigen, 6 bis 11 $\mu$ dicken sowie von zartwandigen, 3 bis 3,5 $\mu$ dicken Hyphen durchsetzt. Der Fruchtkörper besitzt keine eigentliche Mündung, sondern öffnet sich bei der Reife, indem die Scheitelpartie unregelmäßig aufreißt. Die Ge-

häusewand besteht aus vier bis sechs Lagen von polyedrischen, länglichen, außen derbwandigen, dunklen, gegen innen zartwandiger und heller werdenden, 7 bis 10 $\mu$ × 9 bis 18 $\mu$ großen Zellen. Die einem Basalpolster aus hyalinen, zartwandigen, 4,5 bis 6,5 $\mu$ großen Zellen entspringenden Asci sind keulig, kurz gestielt, 45 bis 90 $\mu$ × 11 bis 15 $\mu$ groß und mit einer am Scheitel verdickten Membran versehen. Die Sporen sind hyalin, 10 bis 19,5 $\mu$ × 4 bis 8 $\mu$ groß, spindelförmig und an beiden Enden länglich ausgezogen.

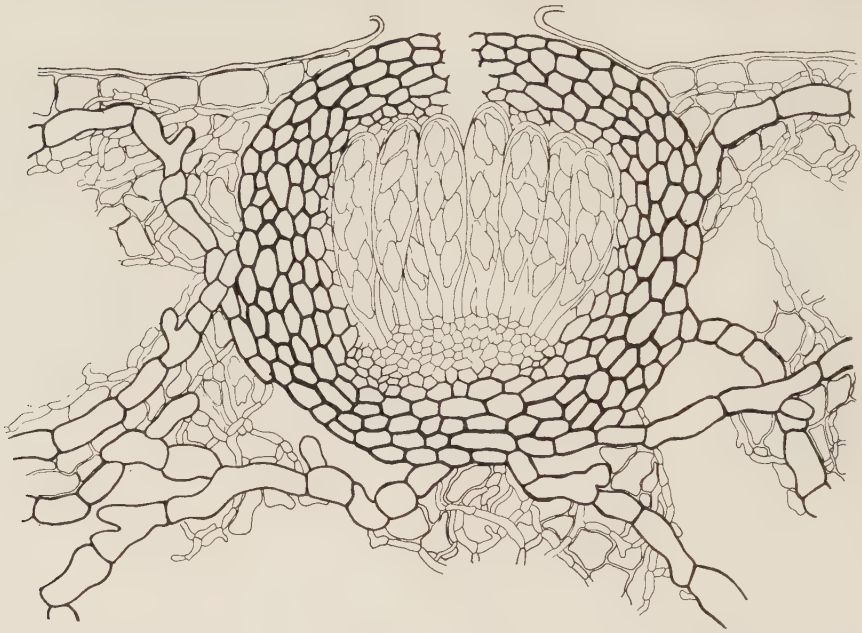


Abb. 4. Schnitt durch ein Perithecium von *Guignardia citricarpa* Kiely auf *Citrus Limon* Burm. Vergr. 500×

Abb. 5. Sporenformen von *Guignardia citricarpa* Kiely: a) Ascosporen, b) Makrokonidien, c) Mikrokonidien. Vergr. 1000×

Die Makrokonidienform gehört in die Formgattung *Phyllostictina* Syd. Sie entwickelt sich auf lebenden und abgestorbenen Blättern, auf reifenden Früchten und hie und da auch auf altem Holz. Die Pyknidien sind 100 bis 155 $\mu$ groß, kugelig oder leicht niedergedrückt. Die Gehäusewand besteht aus drei bis fünf Lagen polyedrischer, 5 bis 8 $\mu$ × 9 bis 15 $\mu$ großer, außen dunkler und derbwandiger, gegen innen zart-

wandiger und heller werdender Zellen. Die hyalinen, eiförmig bis keuligen, 6,5 bis 8,5 $\mu$ × 8 bis 12 $\mu$ großen Konidien werden auf hyalinen, höckerig vorstehenden Konidienträgern einzeln abgeschnürt, verdrängen das feine, hyaline, pseudoparenchymatische, den Fruchtkörper ausfüllende Zellgewebe allmählich gegen die Gehäusewand und gelangen bei der Reife durch einen unregelmäßig aufreißenden Porus nach außen. Die Konidien besitzen meist ein schleimiges, stäbchenförmiges 5 bis 15 $\mu$ langes Anhängsel.

Der Pilz bildet eine Mikrokonidienform, deren Fruchtgehäuse gleich gebaut sind wie die Pyknidien der Makrokonidienform. Hie und da entstehen im gleichen Fruchtkörper Makro- und Mikrokonidien. Letztere sind hyalin, stäbchenförmig, an den Enden oft leicht verdickt, etwa 1 $\mu$ dick und 6 bis 8 $\mu$ lang. Sie können nicht keimen, möglicherweise funktionieren sie als Spermatien.

In Reinkultur bildet *Guignardia citricarpa* hyaline bis olivgrüne, 2 bis 7 $\mu$ dicke, septierte, später bräunliche, bis 10 $\mu$ dicke, kurzseptierte, knäuelig ineinander verwachsende Hyphen. Etwa eine Woche nach dem Isolieren entstehen schwarze Pyknidien, in welchen sich Makrokonidien wie auch Mikrokonidien entwickeln. Die Sporen werden durch eine unregelmäßig aufreißende Öffnung nach außen gepreßt und erscheinen auf den Pyknidien als weißliche, schleimige Masse. Die Gehäusewand besteht aus bräunlichen, polyedrischen, 7 bis 14 $\mu$ großen Zellen.

Über die Gattungszugehörigkeit der *Guignardia citricarpa* bestehen keine Zweifel, da sie in den charakteristischen Merkmalen mit *Guignardia Bidwellii* Viala et Ravaz übereinstimmt (vgl. von Arx und Müller 1954). Auch in bezug auf die Nebenfruchtform verhält sich *Guignardia citricarpa* gleich wie typische *Guignardia*-Arten. Eine Zusammenstellung der Haupt- und Nebenfruchtformen bei *Guignardia* Viala et Ravaz auf Grund von Kulturversuchen wird von Müller (1957) gegeben.

Kiely (1948) erwähnt für Australien verschiedene in der Nähe von *Citrus*-Pflanzungen wild wachsende Bäume und Sträucher als Wirte von *Guignardia citricarpa*. Wager (1952) betrachtet *Eucalyptus* spp. und *Smilax kraussiana* Meisn. als eventuelle Wirtspflanzen des Pilzes. In eigenen Untersuchungen konnten sehr ähnliche Pilze auf *Lagerstroemia indica* L., auf *Royena lycioides* A. DC. und auf *Combritum suluense* Engl. et Diels festgestellt werden. Es muß jedoch durch Infektionsversuche geklärt werden, wie weit die fraglichen Pilze auf ihre Wirte spezialisiert sind.

Sehr ähnlich wie *Guignardia citricarpa* verhält sich auch *Guignardia aesculi* Stewart, der Erreger der Blattfleckenkrankheit auf der Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum* L.). Eingehende Untersuchungen über diesen Pilz wurden von Stewart (1916) veröffentlicht.

### 4. Versuche mit Reinkulturen

#### a) Isolation und Wachstum

Im Laufe der Untersuchungen wurden verschiedene Stämme von *Guignardia citricarpa* Kiely aus *Citrus*-Früchten, -Blättern und -Zweigen isoliert.

Das Versuchsmaterial stammte aus mehreren Gegenden des Ost-, Nord- und Westtransvaal. Der Pilz wurde sowohl aus Ascosporen wie auch aus dem in verschiedenen Teilen des Wirtes vorhandenen Myzel kultiviert.

Um Reinkulturen aus Ascosporen zu bekommen, wurden Fragmente von alten vermodernden Blättern mit reifen Perithecien einige Minuten angefeuchtet und hernach an den Wattepfropf eines Erlenmeyerkolbens mit sterilem Agarnährboden geklebt und bei 27 °C inkubiert. Die reifen Asci schleuderten ihre Sporen nach unten, und nach zwei bis drei Tagen konnten auf dem Agar kleine, weiße Kolonien beobachtet werden, die nach etwa einer Woche ineinander verwachsen waren und wegen der Pyknidienbildung dunkelgrau und im Zentrum schließlich schwarz erschienen. Am Rande dehnte sich die Kultur mit hellem, ästeligem Myzel allmählich weiter aus (vgl. Abb. 6).

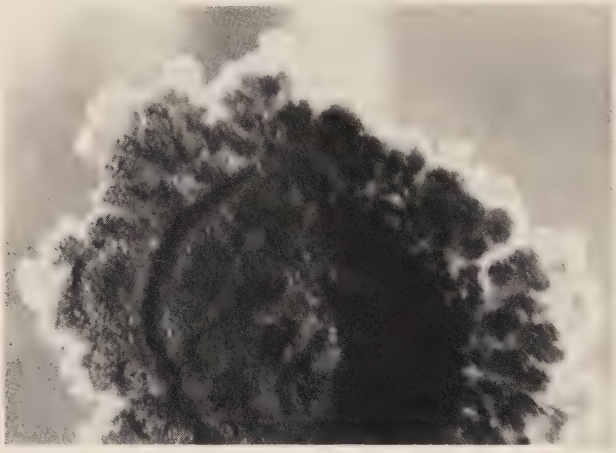


Abb. 6. Reinkultur von *Guignardia citricarpa* Kiely. Nat. Gr.

Reinkulturen konnten auch aus dem im Wirtsgewebe vorhandenen Myzel isoliert werden. Das Pflanzenmaterial wurde nach den üblichen Methoden oberflächlich sterilisiert. Mit Hilfe einer vorn umgebogenen Nadel wurden kleine Gewebeportionen ausgestochen und auf das Nährmedium gebracht. Nach zwei Tagen zeigte sich in den positiven Fällen das charakteristische Myzelwachstum. Bessere Erfolge konnten erzielten werden, wenn das Isolationsmaterial nicht direkt dem Fleck auf Früchten oder Blättern sondern den benachbarten Gewebepartien entnommen wurde, da in den Flecken meist verschiedene sekundäre Parasiten überhandgenommen hatten. Das Myzel ist nicht nur in den äußerlich sichtbaren Flecken lokalisiert, sondern im Gewebe der Wirtspflanze weit verbreitet. *Guignardia citricarpa* befindet sich in Myzelform außer in Blättern und Früchten verschiedenen Alters auch in Blattstielen, Blütenkelchen sowie in jungen krautigen und alten verholzten Zweigen. Ähnliche Resultate erhielten TOKUNAGA und YOKOHAMA (1955) bei Untersuchungen über die Schwarzfleckenkrankheit in Japan. Die aus Ascosporen und die aus Myzel isolierten Kulturen entwickeln sich völlig gleich.

Der Pilz wurde auf ungefähr 50 verschiedenen Nährböden kultiviert in der Hoffnung, die Hauptfruchtform in Reinkultur zu erhalten. Den Nährmedien wurden Blatt- und Fruchtextrakte der verschiedensten Pflanzen wie

auch Extrakte von Früchten und von lebenden und abgestorbenen Blättern und Zweigen einiger *Citrus*-Arten beigegeben. Der Pilz wuchs auf allen Nährböden. Die Kulturen zeigten gewisse Unterschiede in Farbe, Wachstumsgeschwindigkeit und Sporenproduktion, doch wurden auf keinem der Nährmedien Perithecien oder Asci erhalten.

### b) Verhalten in Bezug auf Licht und pH

Schon oft wurde beobachtet, daß die Krankheitssymptome sich zuerst und besonders heftig auf der sonnenexponierten Seite der Früchte entwickelten und auf der Schattenseite des Baumes weniger befallene Früchte vorhanden waren (vgl. Kiely 1948, Wager 1948 b). Diese Tatsache trifft vor allem bei einer Varietät der Süßorange, der Valencia, zu. Ein Einfluß des Sonnenlichtes auf das Myzelwachstum und die Sporenbildung in Reinkultur konnte nicht festgestellt werden. Es ist deshalb anzunehmen, das Sonnenlicht übe auf die Bildung der Krankheitssymptome einen indirekten Einfluß aus, indem die exponierten Gewebezellen in ihrer Disposition der Krankheit gegenüber verändert werden. In Grapefruitpflanzungen kann jedoch die Beobachtung gemacht werden, daß Früchte unten am Baum und gegen den Stamm zu besonders früh Krankheitssymptome zeigen und auch später stärker befallen sind.

In einem weiteren Experiment wurde zu erfahren versucht, ob sich *Guignardia citricarpa* Kiely an die in den Früchten reichlich vorhandene Zitronensäure angepaßt hat, oder ob sich bloß der Säuregrad auf die Physiologie des Pilzes auswirkt. So wurde der Einfluß von Zitronensäure, Milchsäure, Weinsäure und Salzsäure auf das Wachstum des Pilzes untersucht. Verschiedene Konzentrationen der vier genannten Säuren wurden sterilisiert und bei einer Temperatur von 50 °C zum Agarmedium in Petrischalen gegeben. Das pH im Agarmedium wurde bestimmt, die Petrischalen mit gleich großen, aus einer Reinkultur ausgestochenen Myzelscheibchen beimpft, bei 27 °C inkubiert und das Wachstum nach 14 Tagen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

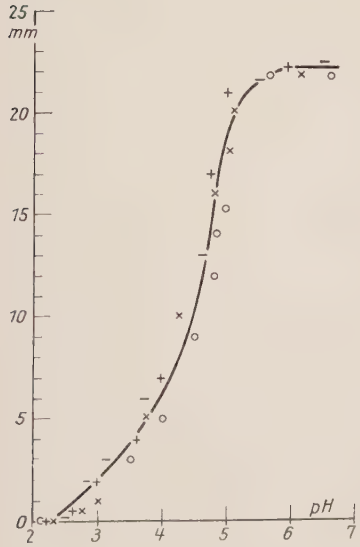



Abb. 7. Der Einfluß verschiedener Säuren auf das Wachstum von *Guignardia citricarpa* Kiely in Reinkultur. Abszisse: pH im Agarmedium variiert durch Zugabe von Verdünnungsreihen verschiedener Säuren: + Zitronensäure, × Weinsäure, — Milchsäure. ° Salzsäure. Ordinate: Durchmesser der Kultur nach 14 Tagen Inkubation

Aus den Versuchen geht hervor, daß das Wachstum des Pilzes nur vom pH und nicht von der Konzentration der verschiedenen Säuren abhängt.

Zum Vergleich wurde das pH im Exokarp, dem gelben Teil der Schale, von Zitronen verschiedenen Alters bestimmt. Das Exokarp wurde weggeschält, in einem Mörser fein zerquetscht, und nach der Beigabe einiger Tropfen Wasser konnte das pH bestimmt werden. Der Säuregrad erwies sich bei den Früchten verschiedenen Alters als gleich und schwankte nur wenig um 5,5. Ähnliche pH-Werte wurden von BARTHOLOMEW und SINCLAIR (1951) angegeben. Von *Guignardia citricarpa* stark befallene Früchte zeigten im Exokarp ein pH um 6,5.

### 5. Infektionsversuche

Nach KIELY (1945) hat *Guignardia citricarpa* Kiely eine sehr lange Inkubationszeit, meist 12 bis 36 Monate. In anderen Fällen verursacht eine Infektion überhaupt keine Erkrankung. So sind *Citrus*-Anbaugebiete bekannt, in welchen *Guignardia citricarpa* nur im latenten Stadium vorhanden ist. In solchen Gegenden kann der Pilz aus scheinbar gesunden *Citrus*-Früchten und *Citrus*-Blättern isoliert werden. Er bildet auch auf abgefallenen, alten Blättern zahlreiche Pyknidien und oft auch Perithecien. Über die Tatsache, daß der Erreger der Schwarzfleckenkrankheit auch in Südafrika im latenten Stadium vorhanden ist, wurde zum erstenmal von WAGER (1948 a) berichtet. In einer weiteren Arbeit (WAGER 1949) hat der Autor eine ausführliche Zusammenstellung über das Vorkommen der latenten und der sichtbaren Form in den wichtigsten südafrikanischen *Citrus*-Anbaugebieten veröffentlicht. KIELY (1948) fand eine Methode, um auf frisch gepflückten, keine Krankheitssymptome zeigenden Blättern Pyknidien und später auch Perithecien zur Entwicklung zu bringen und damit die latente Form des Pilzes festzustellen. Der Autor gab folgendes Vorgehen als das erfolgreichste an: Die Blätter werden vom Baum genommen, im Freien 12 Stunden gewelkt, in kaltes Wasser gelegt, getrocknet und bei 27 °C inkubiert. Jeden Tag werden die Blätter aus dem Inkubator genommen, eine halbe Stunde in kaltes Wasser gelegt, über Nacht trocknen gelassen und am Morgen wieder in den Thermostat gebracht. Der tägliche Wechsel zwischen feucht und trocken und der periodische Temperaturunterschied scheinen die optimalen Umweltbedingungen für die Entwicklung des Pilzes darzustellen.

Da Isolationsversuche das Vorhandensein des Pilzmyzels in Zweigen und anderen Pflanzenteilen zeigten, wurde eine ähnliche wie die oben beschriebene Methode angewandt, um den Pilz auch auf Zweigen zur Bildung von Fruchtformen zu bringen. Zweige von infizierten Bäumen wurden in kurze Stücke geschnitten, getrocknet, bei 27 °C inkubiert und täglich eine halbe Stunde ins Wasser gelegt. Nach drei bis vier Wochen entwickelten sich Pyknidien mit Mikro- und Makrokonidien, und nach etwa vier Monaten konnten darauf Perithecien gefunden werden. In die Untersuchungen wurden

junge, zarte Sprosse und alte verholzte, bis 1,5 cm dicke Äste einbezogen; der Pilz entwickelte die Fruktifikationsorgane auf den jungen wie auf den alten Zweigen.

Untersuchungen über den Infektionsvorgang sind insofern schwierig, als der Infektionserfolg erst nach Monaten oder überhaupt nicht durch Krankheitssymptome sichtbar wird. Das Haften von Infektionen muß entweder durch Isolationen des Myzels aus dem infizierten Gewebe oder durch die im letzten Abschnitt beschriebene Methode zur Entwicklung des Pilzes auf abgestorbenem Pflanzenmaterial festgestellt werden. Der Infektionsvorgang und die Ausbildung der Symptome müssen klar auseinandergehalten werden. Das Pflanzenmaterial für Infektionsversuche ist mit besonderer Vorsicht auszusuchen, um nicht bereits latent infizierte Pflanzen zu verwenden. Es müssen drei Infektionsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden: die Infektion durch Konidien, durch Ascosporen und durch Myzel.

Infektionsversuche mit Konidien von *Guignardia citricarpa* wurden an jungen, etwa einen Meter hohen, aus Samen aufgezogenen Bäumchen verschiedener *Citrus*-Arten durchgeführt. Als Infektionsmaterial dienten Konidien aus Pyknidien von Reinkulturen und von befallenen *Citrus*-Früchten und -Blättern. Es wurden verschiedene Infektionsmethoden angewendet, wobei auch die Infektion durch die Blattnarben und durch Verletzungen auf den Blättern in Betracht gezogen wurde. Mit Konidien konnten in eigenen Versuchen aber nie positive Infektionserfolge festgestellt werden. Wager (1949, 1952) berichtete allerdings von Infektionserfolgen mit Pyknosporen. Verschiedene seiner Experimente wurden jedoch an bereits latent infizierten Bäumen durchgeführt. Kiely (1948) erwähnt ebenfalls positive Infektionsergebnisse mit Pyknosporen; er betrachtet die Pyknosporen jedoch als weniger bedeutend für die Infektion, was er durch eindeutige Hinweise auf verschiedene Versuchsergebnisse und Beobachtungen belegt.

Die beiden oben erwähnten Autoren führten dagegen mit gutem Erfolg zahlreiche Infektionsexperimente mit Ascosporen durch. Nach ihrer Erfahrung haftet die Ascosporeninfektion nur auf jungen Blättern und Früchten. Nach Kiely (1948) sind die Ascosporen als Träger der Infektion zu betrachten.

In eigenen Experimenten wurde die Bedeutung einer dritten Infektionsmöglichkeit, der Infektion durch Myzel, näher untersucht. Da das Myzel in weiter oben beschriebenen Untersuchungen nicht bloß in Blättern und Früchten, sondern auch in Zweigen gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, daß es bei der Neuinfektion der jungen Pflanzenteile eine Rolle spielen kann. Die Vermutung wurde bestärkt durch Untersuchungen über das Vorhandensein von Ascosporen im Verlauf des Jahres. Im Vegetationsjahr 1959/1960 konnten im Lowveld, Ost-Transvaal, besonders in den „Crocodile-Valley-Citrus-Estates" und in der *Citrus*-Versuchsstation in Nelspruit in den Monaten Juli bis Dezember auf den alten Blättern unter den Bäumen verschiedener *Citrus*-Arten keine Perithecien gefunden werden. In Laborversuchen ließ sich bei Behandlung der Blätter die Hauptfruchtform zur Entwicklung und Reife bringen. In den Monaten Juli, August und September benötigten die Perithecien eine längere Zeit, um reife Asci auszubilden, als in

den späteren Monaten. Erst nach den beträchtlichen Regenfällen im Januar und Februar konnte die Entwicklung der Hauptfruchtform im Felde festgestellt werden, und im März waren die alten, vermodernden Blätter meist völlig überdeckt von Fruchtkörpern mit reifen Asci. Diese Beobachtungen zeigten, daß während der Blütezeit und der Entwicklung der jungen Früchte im Frühling und anfangs Sommer, das heißt von Juli bis Dezember, keine reifen Ascosporen vorhanden waren. Gleichwohl wiesen die Grapefruits beträchtliche, durch die Schwarzfleckenkrankheit verursachte Schäden auf. Auch bei der Ernte der Navel, einer Varietät der Süßorange, gab es infizierte Früchte. Der durch *Guignardia citricarpa* bewirkte Ausfall bei den Navel ist erfahrungsgemäß allerdings allgemein gering. Der Befall der Varietät Valencia konnte zu dieser Zeit nicht beurteilt werden, da die Früchte noch nicht reif waren. Der heftige Krankheitsausbruch bei Grapefruit trotz des Fehlens von Infektionsmaterial in Form von Ascosporen läßt vermuten, daß das intramatrikal vorhandene Myzel sich im Baume weiter ausbreiten kann und von infizierten Zweigen aus in die neuen Knospen und Blätter und später auch in die Früchte wächst.

Um die Möglichkeit der Myzelinfektion näher zu studieren, wurden 5 bis 15 cm lange Reiser von stark befallenen Zitronenbäumen von den „Crocodile-Valley-Citrus-Estates" im Gewächshaus auf gesunde, nicht latent infizierte, etwa dreijährige Bäumchen gepfropft. Die Pfropfungen wurden anfangs Januar ausgeführt, und bis Mitte Juni waren auf etwa 20 % der gepfropften Reiser Schosse verschiedener Länge gewachsen. Die Blätter der neugebildeten Zweige, auf welchen keine Krankheitssymptome sichtbar waren. wurden nach der oben beschriebenen Methode behandelt, um das eventuell vorhandene Myzel zur Fruchtkörperbildung zu bringen. Nach etwa einer Woche entwickelten sich auf verschiedenen Blättern der gepfropften Zweige Makro- und Mikrokonidien von *Guignardia citricarpa*. Die Pfropfversuche bestätigten die Möglichkeit, daß das latent vorhandene Myzel auf die neu gebildeten Pflanzenteile übergreifen kann. Das Myzel muß also nach den dargelegten Versuchsergebnissen als Infektionsquelle in Betracht gezogen werden. Welche Bedeutung die Myzelinfektion im Feld besitzt, bleibt noch zu klären.

### 6. Bekämpfungsmöglichkeiten

Zur Bekämpfung wurden bis anhin allgemein Kupferpräparate, im besondern Bordeauxbrühe, als wirksamste Mittel empfohlen und mit ihnen auch relativ gute Resultate erzielt (vgl. KIELY 1945, 1957, WAGER 1950, LOEST 1958, FOCHESSATTI 1959). In der Regel werden drei Spritzungen während des frühen Stadiums der Fruchtentwicklung ausgeführt. Mehr Behandlungen sind aus wirtschaftlichen Gründen und wegen Kupferschädigung der Bäume nicht ratsam. Leider werden bei Behandlung mit Kupferverbindungen auch verschiedene auf Insekten parasitierende und diese unter biologischer Kontrolle haltende Pilze bekämpft. Als unangenehme Nebenerscheinung führt

deshalb die Anwendung von Kupfermitteln zu einer Massenvermehrung von Schildläusen. Es wird somit bei Behandlung mit Kupfer eine zusätzliche Bekämpfung der entomologischen Schädlinge nötig.

Dem Spritzbelag kommt als Schutz gegen die Infektion keine Bedeutung zu, da einerseits während der Dauer der Behandlungen keine reifen Ascosporen vorhanden sind (vgl. S. 267) und andererseits der Erreger durch das im Wirtsgewebe bereits vorhandene Myzel (vgl. S. 264) sich weiter ausbreiten kann. Der Pilz läßt sich auch in Früchten und Blättern von erfolgreich mit Bordeauxbrühe behandelten Bäumen feststellen. Ebenso erwähnt Kiely (1948), die alljährlich öftere Behandlung mit Bordeauxbrühe reduziere das Sporenangebot und die Verbreitung des Pilzes keineswegs, es dürfe auch nach langjähriger Behandlung keine Spritzung ausgelassen werden.

Die relativ gute Wirkung von Kupfermitteln muß somit durch einen direkten oder indirekten Einfluß auf den im Wirtsgewebe bereits vorhandenen Pilz zurückzuführen sein, wodurch dieser an der Ausbildung der Krankheitssymptome gehindert wird. Es bleibt noch zu untersuchen, ob das Kupfer zufolge einer geringen Tiefenwirkung den Pilz nicht an die Oberfläche des Gewebes vorstoßen läßt, oder ob der Spritzbelag die Physiologie der Wirtspflanze und somit deren Disposition gegenüber dem Erreger verändert.

*Guignardia citricarpa* Kiely bedarf gewisser ökologischer oder klimatischer Voraussetzungen, um auf dem lebenden Gewebe zu fruktifizieren und dadurch die Erkrankung auszulösen. Die Erkrankungsdisposition des Wirtes kann durch Baumpflege beeinflußt werden. Der Baum erlangt z. B. durch regelmäßiges Zurückschneiden eine bedeutend höhere Abwehrbereitschaft, die ihn befähigt, den latent vorhandenen Pilz in Schach zu halten. Die verminderte Krankheitsbereitschaft der Bäume während der ersten zehn Lebensjahre (vgl. Kiely 1948) deutet darauf hin, daß *Guignardia citricarpa* einer durch das Alter bedingten Umstimmung der Wirtspflanze bedarf, um die Krankheit zum Ausdruck zu bringen, da in verseuchten Gegenden der Pilz auch in jungen Bäumen latent vorhanden ist. In erster Linie sollten die Faktoren erforscht werden, die es dem latent, in harmloser Form vorhandenen Myzel ermöglichen, bei der Wirtspflanze zur Erkrankung zu führen, um durch pflanzenbauliche Maßnahmen die Abwehrbereitschaft der *Citrus*-Bäume zu erhöhen.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen über das Verhalten von *Guignardia citricarpa* Kiely, den Erreger der Schwarzfleckenkrankheit der *Citrus*-Früchte, in Reinkultur und über dessen Lebenszyklus dargelegt. Nach einem geschichtlichen Überblick werden die Krankheitssymptome besprochen. Morphologische Untersuchungen bestätigen die Ansichten Kielys (1948) über die systematische Stellung des Pilzes.

Reinkulturen können aus Ascosporen oder aus dem im Wirtsgewebe vorhandenen Myzel gewonnen werden. Isolationsversuche zeigen, daß der

Krankheitserreger nicht bloß in Blättern und Früchten vorhanden ist, sondern alle Pflanzenteile besiedeln kann. Das Licht übt keinen direkten Einfluß auf das Wachstum von *Guignardia citricarpa* aus. Versuche über die pH-Abhängigkeit des Pilzes zeigen eine Wachstumshemmung, wenn das pH unter 5,5 sinkt; unter pH 2,5 ist kein Wachstum nachweisbar.

Infektionen im Gewächshaus durch Pfropfen von infizierten Zweigen auf gesunde Pflanzen bestätigen die Infektionsmöglichkeit durch das im Pfropfreis latent vorhandene Myzel. Das in infizierten Zweigen vorhandene Myzel greift auf die neugebildeten Pflanzenteile über. Da der Pilz latent im Wirtsgewebe vorhanden ist, wird die chemische Bekämpfung erschwert. Vor allem scheint auch eine Infektionsprophylaxe zwecklos. Die in der Praxis durch Kupfermittel erreichten Erfolge müssen auf eine Hemmung, nicht aber auf ein Abtöten des Erregers zurückgeführt werden. Als Bekämpfung sollte in erster Linie die Abwehrbereitschaft der *Citrus*-Bäume durch pflanzenbauliche Maßnahmen erhöht werden. Der *Citrus*-Pflanze könnte dadurch geholfen werden, den Ausbruch der Krankheit zu verhindern.

## Summary

„Black-Spot-Disease" of *Citrus* caused by *Guignardia citricarpa* Kiely has been investigated. A short historical review of the disease has been given and the symptoms caused have been described. The morphology of the fungus confirms the opinion of KIELY (1948) on its systematic position.

Pure cultures can be isolated from ascospores or from the mycelium present in the tissue of the host plant. The mycelium of the fungus is found not only in the leaves and fruits but also in the petioles of the leaves, fruitstalks, twigs and flowers. Light has no direct influence on the growth of *Guignardia citricarpa*. Investigations on the effect of pH show that the fungus is inhibited if the pH falls below 5.5; below pH 2.5 there is no growth.

Infection experiments by grafting infected twigs on healthy trees prove that the mycelium can spread from the infected twigs to the new parts of the plant. Good results are generally obtained by spraying copper compounds, although the fungus is usually present inside the tree. The action of the copper, therefore, seems not to be preventing the infection but inhibiting the fungus to express the symptoms of the disease.

## Literaturverzeichnis

ARX, J. A. VON, und E. MÜLLER, 1954: Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. Beitr. Kr. Fl. Schweiz **11** (1), 1—434.

BARTHOLOMEW, E. T., and W. B. SINCLAIR, 1951: The Lemon Fruit, its Composition, Physiology and Products. 72—74, Berkeley and Los Angeles.

BENSON, A. H., 1895: Black Spot of the Orange. Agric. Gaz. N. S. W. **6**, 249—251.

Doidge, E. M., 1929: Some Diseases of *Citrus* Prevalent in South Africa. South African J. Sci. **26**, 324.

Fawcett, H. S., 1936: *Citrus* Diseases and their Control. 524—527, New York and London.

Fochessatti, A. P., 1959: Black Spot control: Protection afforded by spray programme. Citrus Grower **309**, 7—9.

Kiely, T. B., 1945: Spray Programmes for Coastal Growers. Agric. Gaz. N. S. W. **56**, 391—392.

— —, 1948: Preliminary Studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: the Ascigerous Stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its Relation to Black Spot of *Citrus*. Proc. Linn. Soc. N. S. W. **73**, 249—292.

— —, 1949: Black Spot of *Citrus*. Agric. Gaz. N. S. W. **60**, 17—20.

— —, 1957: Black Spot of *Citrus*. Plant Disease Leaflet No. 11, 1—8.

Loest, F. C., 1958: Black Spot Responsible for Severe Financial Losses. Farming in South Africa **34**, No. 9, 33.

McAlpine, D., 1899: The Fungus Diseases of *Citrus* Trees in Australia. 20—22, Melbourne.

McCleery, F. C., 1939: Black Spot of *Citrus*. A Brief Summary of Control Experiments, 1925—1939. Agric. Gaz. N. S. W. **50**, 618—622.

Müller, E., 1957: Haupt- und Nebenfruchtform bei *Guignardia* Viala et Ravaz. Sydowia, Annales Mycologici, Beiheft I, Festschrift für Franz Petrak, 210—224.

Stewart, V. B., 1916: The Leaf Blotch Disease of Horse-Chestnut. Phytopathology **6**, 5—19.

Tokunaga, Y., and M. Yokohama, 1955: Latent infections associated with some fruit diseases. Jubilee Publication in Commemoration of the Sixtieth Birthday of Prof. Tochinai & Prof. Fukushi, 249—254, Minato-Ku, Tokyo.

Wager, V. A., 1948 a: The Distribution of the Black Spot Fungus in South Africa. The Citrus Grower **174**, 4.

— —, 1948 b: The Black Spot Disease of *Citrus*. Ibid. **175**, 7—8.

— —, 1949: The Occurrence of the Black Spot Fungus in the *Citrus* Areas of South Africa. Farming in South Africa **24**, 367—369, 374.

— —, 1950: Spraying for the Control of Black Spot in *Citrus*. Ibid. **25**, 226—228.

— —, 1952: The Black Spot Disease of *Citrus* in South Africa. Sci. Bull. Dept. Agric. South Africa **303**, 1—52.

*Aus dem Phytopathologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*

*Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski*

# Die Verwendung eines Serums gegen normale Pflanzeneiweiße für die Gewinnung eines hochwertigen Antigens

Von

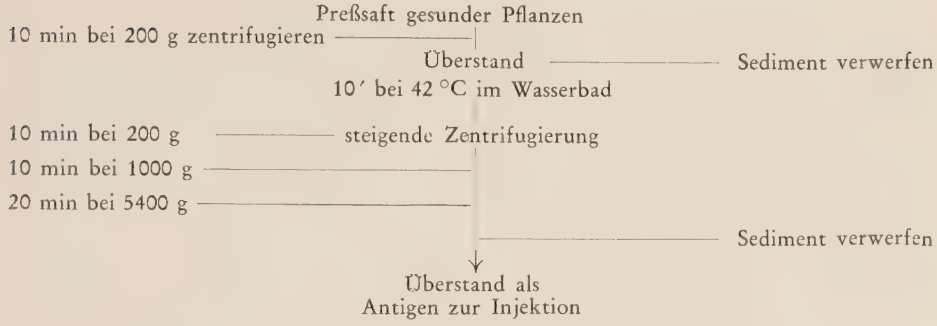
C. Oertel

*Mit einer Abbildung*

Die Herstellung eines hochtitrigen Antiserums des Tomatenaspermievirus (TAV) ist, wie auch bei anderen Viren, immer wieder an dem hohen Anteil normaler Pflanzeneiweiße (NPE) im Antigen gescheitert. Derartige Antigene ergaben Antiseren, die eine weitgehende Reaktion gegen NPE aufwiesen und für zuverlässige Diagnosezwecke oder Verwandtschaftsuntersuchungen ungeeignet waren. Govier (1957) erhielt bei intraperitonealer Injektion der Tiere mit rohem TAV-haltigem Tabakpreßsaft ein Antiserum, das bis 1 : 64 mit dem Preßsaft gesunder Pflanzen reagierte und gegen das Virus nur einen Titer von 1 : 512 besaß. Noordam (1952) injizierte intravenös ebenfalls rohen dialysierten TAV-haltigen Tabakpreßsaft. Er bekam nach Absättigung mit dem Preßsaft gesunder Pflanzen einen Serumtiter von 1 : 32 ± gegen TAV. Unsere Untersuchungen sollten prüfen, in welcher Weise sich im Laufe des Jahres in TAV-infizierten Gewächshauspflanzen von *Nicotiana tabacum* L. var. „Samsun S" das Verhältnis von NPE zu Viruseiweiß ändert. Wir hofften, einen günstigen Zeitpunkt für die Reinigung des Antigens zu finden, in der die Pflanzen einen hohen Virustiter, aber wenig NPE besitzen. Um sowohl den Anteil der NPE bei der Aufarbeitung als auch ihren Titer in der Pflanze während des jahreszeitlichen Verlaufes prüfen zu können, stellten wir ein Antiserum mit NPE her.

In den Monaten Mai bis Juli wurden gesunde Pflanzen von *N. tabacum* var. „Samsun S" etwa 10 Wochen alt, im 10-Blattstadium zermörsert und der Preßsaft dem nachstehenden Schema entsprechend behandelt.

Schema I




Das Antigen war eine wasserklare, schwach grüne Flüssigkeit, mit einem Titer von 1 : 256 NPE. Es wurde in folgendem Rhythmus injiziert:

Schema II

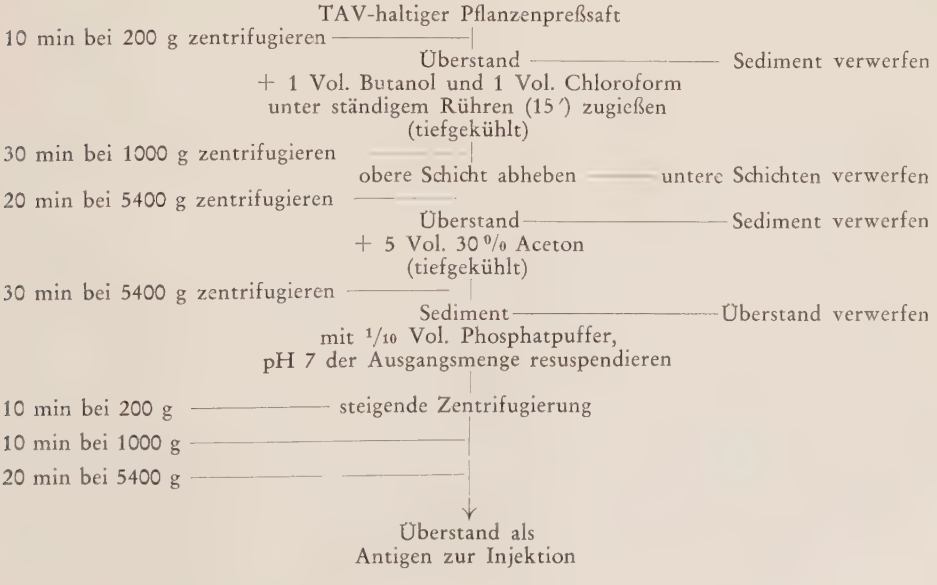
Dreimal 1 ml an aufeinanderfolgenden Tagen, drei Tage Pause.
Dreimal 2 ml an aufeinanderfolgenden Tagen, drei Tage Pause.
Dreimal 3 ml an aufeinanderfolgenden Tagen, drei Tage Pause.
Dreimal 4 ml an aufeinanderfolgenden Tagen.

Die Blutentnahme erfolgte am fünften Tage nach der letzten Injektion. Der Titer des Antiserums betrug 1 : 256.

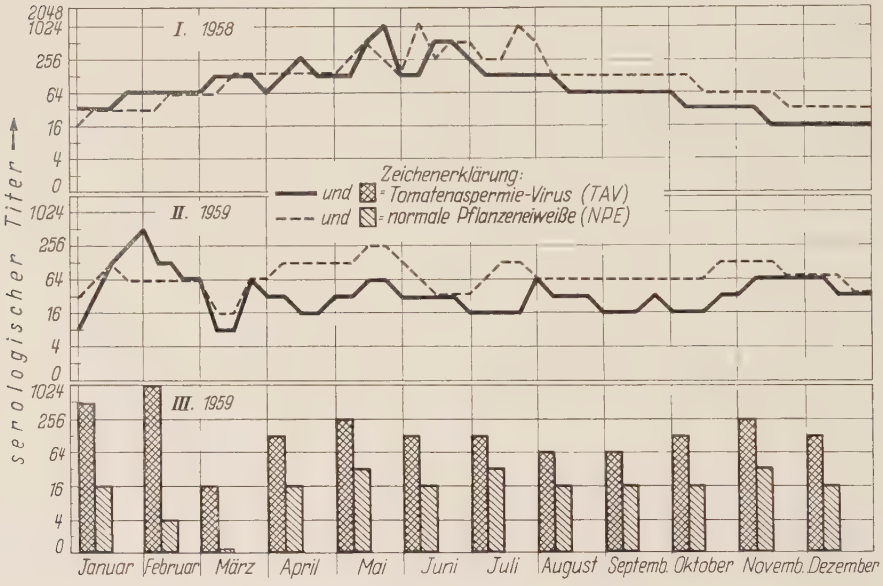
Für das Antiserum des TAV, das zur Kontrolle des jahreszeitlichen Titerverlaufs notwendig war, wurde das Antigen — modifiziert nach Steere (1956) sowie Bercks und Gehring (1957) — hergestellt.

*N. tabacum* var. „Samsun S" wurde 4 Wochen nach der Infektion zermörsert und folgendermaßen behandelt:

Schema III



Bei einem Titer des Ausgangspreßsaftes von 1 : 128 NPE und TAV erhielten wir durchschnittlich nach dieser Reinigungsmethode ein Antigen mit einem Titer von NPE 1 : 16 und TAV 1 : 512. Der Injektionsrhythmus war der gleiche wie bei Schema II. Der Titer des Antiserums betrug fünf Tage nach der letzten Injektion 1 : 16 gegen NPE und 1 : 1024 gegen TAV. Mit den Antiseren des TAV und der NPE wurde während zwei Jahren der Verlauf des Virustiters und der Gehalt an NPE in den Samsunpflanzen serologisch bestimmt (Abb.). Die Pflanzen, die zur Prüfung gelangten, waren




Verhältnis der normalen Pflanzeneiweiße zum Viruseiweiß während eines Jahres. I. und II. Serologischer Titer in der Pflanze (*Nicotiana tabacum* var. Samsun), III. Serologischer Durchschnittstiter im gereinigten Antigen

durchschnittlich 4 Wochen nach der Infektion geerntet. Die Klärung des Pflanzenpreßsaftes erfolgte wie in Schema I. Die Titer wurden mit der üblichen Präzipitinreaktion im Tropfen festgestellt.

Die Maxima des Virustiters lagen in den beiden Untersuchungsjahren sehr unterschiedlich. Für 1958 ist aus der Kurve (Abb.) ein allmählicher Anstieg des Virustiters und der NPE mit einem Maximum in den Monaten Mai/Juni zu erkennen. Danach lagen die Titer der NPE stets über dem Virustiter der Pflanze und es folgte von August bis Ende des Jahres ein langsamer Titerabfall des Virus und der NPE.

Das Jahr 1959 zeigte einen vollkommen anderen Verlauf der Kurve, wofür man vielleicht die intensive Sonneneinstrahlung, vom zeitigen Frühjahr an, verantwortlich machen darf. Der steile Titerabfall im März hing offensichtlich damit zusammen, denn bei anschließendem Schattieren stieg der Virustiter wieder an. Der Jahresdurchschnitt des Virustiters für 1958 lag

bei 1 : 127, für 1959 bei 1 : 54. Der Jahresdurchschnitt des Titers der NPE war 1958 1 : 176 und 1959 1 : 84.

Die Kurve hat insofern Bedeutung, als man aus ihr ablesen kann, daß während relativ weniger Wochen der Virustiter (TAV) über dem der normalen Pflanzeneiweiße liegt. In den Treppenpolygonen der Tafel ist der Titer des Antigens von TAV und NPE nach der Reinigung aufgetragen. Diese Zahlen sind Durchschnittswerte, die sich 1959 aus mehreren Aufarbeitungen (Schema III) während der entsprechenden Jahreszeit ergaben. Nur in den Monaten Januar/Februar war die Herstellung eines Antigens mit günstigem Verhältnis von NPE zu TAV möglich. In dieser Zeit wurde auch ein TAV-Antiserum mit einem Virustiter von 1 : 1024 und einem Titer an NPE von 1 : 16 gewonnen.

Die Titer der gereinigten Antigene liegen im Verlauf eines Jahres zwischen einem Anteil an NPE von 1 : 16 bis 1 : 32 und hängen stets vom Titer der NPE in der Wirtspflanze ab. Je höher deren Titer in der infizierten Pflanze ist, desto geringer ist die Aussicht, ein hochgereinigtes Antigen zu erhalten. Bei der Anreicherung des Virus durch die Acetonfällung erhält man stets größere Mengen NPE im Sediment. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen deutlich, wie schwierig es ist, für die Virusreinigung ein allgemein gültiges Rezept anzugeben. Je nach dem Verhältnis des Virus zu den NPE im Ausgangspreßsaft wird das Antigen einen mehr oder weniger hohen Anteil an NPE besitzen. Die Verwendung eines Serums gegen NPE bietet nicht nur die Möglichkeit, die verschiedenen Stufen der Virusreinigung auf ihren Erfolg zu prüfen, sondern erlaubt eine ziemlich sichere Voraussage, bei welchem Titer des Ausgangspreßsaftes eine Virusreinigung Aussicht auf Erfolg hat.

Da das TAV-Antiserum für den serologischen Test an Chrysanthemen in der gärtnerischen Praxis in größeren Mengen verwendet wird (Oertel 1959), ist es notwendig, die Herstellung des Antiserums während des ganzen Jahres durchführen zu können. Um zu einem Virusantigen ohne NPE zu kommen, sättigen wir Antigene, die einen ausreichenden Virustiter, aber gleichzeitig einen hohen Anteil an NPE besitzen (z. B. TAV 1 : 256 und NPE 1 : 32) in einem Verhältnis von 1 : 1 mit dem Antiserum NPE ab. Nach einstündiger Erwärmung bei 37 °C im Wasserbad wird das entstandene Präzipitat 20′ bei 5400 abzentrifugiert. Der klare Überstand reagiert serologisch nicht mehr mit dem Antiserum NPE und hat einen Virustiter von 1 : 256. Derartige Antigene können bedenkenlos über längere Zeiten injiziert werden, ohne eine Antikörperbildung gegen NPE auszulösen. Bei Anwendung des oben beschriebenen Injektionsrhythmus (Schema II) wird ein TAV-Antiserum mit einem Titer von 1 : 2048 gegen TAV, ohne eine Reaktion gegen NPE gewonnen. Wir nehmen an, daß Dunnin und Popova (1937) nach dem gleichen Prinzip gearbeitet haben, leider konnten wir keine genaueren methodischen Angaben erhalten. Zur Nachimmunisierung sind diese abgesättigten Antigene ebenfalls gut geeignet, da sie kein Ansteigen der Antikörperbildung gegen NPE auslösen, wie das gewöhnlich bei der Nachimmunisierung geschieht.

## Zusammenfassung

Es wird die Herstellung eines Serums gegen normale Pflanzeneiweiße (NE) beschrieben. Dieses Serum kann für folgende Untersuchungen verwendet werden:

1. Zur Kontrolle des Verhältnisses der NE zum Viruseiweiß in *Nicotiana tabacum*, die mit dem Tomatenaspermie-Virus infiziert waren, während des Jahresablaufs.

2. Zur Prüfung des partiell gereinigten Virus auf den Anteil NE.

3. Zur Absättigung von Antigenen, die noch NE besitzen. Man erhält mit derartig abgesättigten Antigenen hochtiterige Antiseren, die nicht mit NE reagieren.


## Literaturverzeichnis


Bercks, R., und F. Gehring, 1957: Über Verwandtschaftsbeziehungen und Konzentrationsverhältnisse bei Viren der Tabak-Ringspot-Gruppe. Phytopath. Z. **28**, 57—69.

*Dunin, M. S., und N. N. Popova, 1937: Kapelnyj metod analiza virusov v rasteniewodstve. Moskau.

Govier, D. A., 1957: The properties of tomato aspermy virus and its relationship with cucumber mosaic virus. Ann. appl. biol. **45**, 62—73.

Noordam, D., 1952: Virusziekten bij chrysanten in Nederland. T. plantenziekten **58**, 121—189.

Oertel, C., 1959: Der serologische Test und seine Bedeutung bei der Bekämpfung des Aspermie-Virus an *Chrysanthemum indicum*. Dt. Gartenbau **6**, 191—193.

Steere, R. L., 1956: Purification and properties of tobacco ringspot virus. Phytopathology **46**, 60—69.


* Nur im Referat zugänglich.

*Tocklai Experimental Station, Indian Tea Association, Cinnamara (Assam)*

# Notes on fungi from North-east India. VII-*Tunstallia* gen. nov. causing the „Thorny Stem Blight" of tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze)

By

V. Agnihothrudu

*With 5 figures*

*Aglaospora aculeata* was described by Petch in 1906 from Ceylon as occurring "in ramis nigrificatis *Theae viridis*". He called it the "Thorny Stem Blight of Tea" which could be "readily recognized by the black thorns that are produced on the dead branches. These thorns are tops of the fructifications of the fungus, and they are arranged either in straight lines or in more or less concentric circles each thorn being surrounded by an area of slightly raised and cracked bark."

Thorny stem blight of tea occurs in the tea growing tracts of North-east India and is very prevalent in the hill district of Darjeeling but it is comparatively rare on tea growing on the plains of Assam (Tunstall 1940 and Tunstall and Sarmah 1947).

The disease is typically one affecting the stems and branches of the tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. A few instances where the fructifications of the fungus were traced to the roots are on record but the author has not come across such specimens during his collection tours.

In most of the cases observed by the writer, the disease kills single branches; where the fungus has penetrated deep down the main stem(s) or collar, the death of the whole bush is evident. The fungus is too obvious during its fructifying period to escape notice. The black thorns in typical cases are produced on completely dead wood. The thorns, however, are not very prominent in most of the cases and in a few instances but for the slight excrescences no suggestion of structures that could be justifiably termed thorns are observed. The thorny projections are the apices of the erumpent stroma of the fungus. This gives a rough pustular surface to the infected part. The area surrounding the thorns is oftentimes raised and cracked. The perithecia are immersed in the cortical tissue; they are strongly stromatic,

carbonaceous and aggregated into groups up to 5 in number. The perithecial cavities are depressed and open into a common conical ostiolum which projects through the bark in the form of a thickset thorn and hence the name "Thorny Stem Blight". The asci are clavate to cylindrical with a truncate apex and a slightly recurved pedicel. Spores 4 or 8 in an ascus, fasciculate, cymbiform or anguilliform.

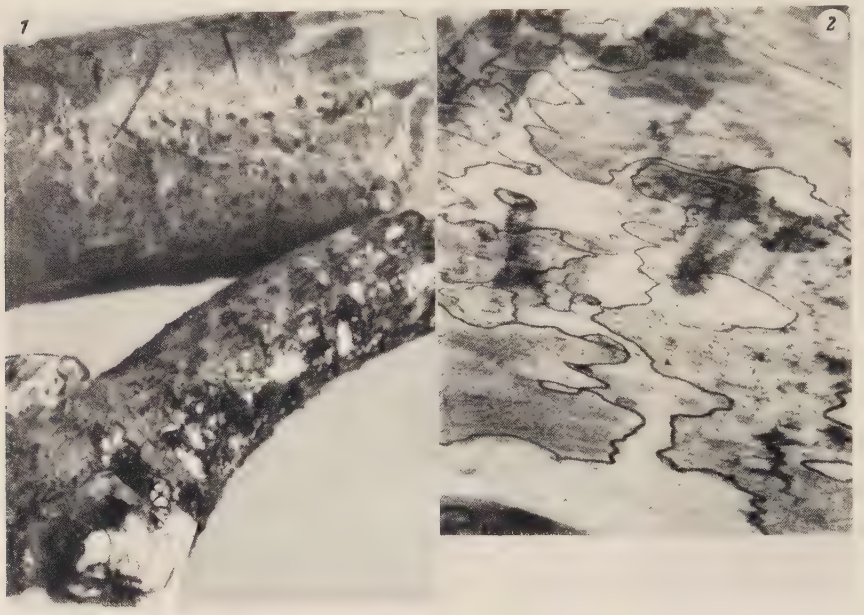



Fig. 1. *Tunstallia aculcata.* Two pieces of tea branch bearing the thorny fructifications of the fungus

Fig. 2. *Tunstallia aculeata.* A longitudinal section of the infected branch showing the black lines inlaying the wood (× 4)

PETCH (1906) included *Aglaospora aculeata* under phragmosporus sphe-riaceae. His description of the ascus and the spores runs as follows "ascis cylindraceis, apice truncate attenuatis, stipite curvato, quadrisporis, 180—210 × 30—35 $\mu$; sporidiis in medio asco maturato aggregatis, cymbifor-mibus, 90—105 × 12—15 $\mu$ primum viridi-hyalinis, continuis, plasmate angulato in guttum albus expulsis, deinde fuligineis 7—11 septatis". From his description it is very clear that the fungus has spores that are 7 to 11 septate when mature. In the experience of the writer, none out of the 150 specimens examined from North-east India had septate spores. The spores are invariably continuous. Specimens obtained from Ceylon as well as from Kew similarly showed continuous ascospores that are subhyaline but not fuliginous as claimed by PETCH (loc. cit.) although pseudosepta formed by the intervacuolar spaces were very common in the North-east Indian as well as the Ceylonese specimens. It is not improbable that PETCH mistook the pseudosepta to the true septa.

In 1941 WEHMEYER erected the genus *Phragmodiaporthe* with the type *Phragmodiaporthe caryae* (Peck) Comb. nov. (syn. *Cryptospora caryae* Peck), which according to him has clustered, valsoid perithecia with the entostromatic areas definitely demarcated by a blackened zone which is continuous between the perithecial groups (pustules). Asci 8 (or 4?) -spored; spores fusoid elliptic to elongate, four to many celled, hyaline or brown. He included *Aglaospora aculeata* Petch under this genus making a new combination *Phragmodiaporthe aculeata* (Petch) Wehmeyer. This is obviously the second species of the genus *Phragmodiaporthe.* WEHMEYER (loc. cit.) examined the type material of *Aglaospora aculeata* from Kew and while proposing the new combination observed thus "The material examined was immature and showed four-spored asci. The spores were one-celled and hyaline, although PETCH describes the spores as seven- to eleven-septate and brown at maturity." Evidently WEHMEYER as he was not certain whether the type he was examining was mature or not included *Aglaospora aculeata* under *Phragmodiaporthe* purely on the strength of PETCH's description of the spores of the former as typically phragmosporous. In the meantime Dr. L. E. WEHMEYER examined a further set of specimens from North-east India sent by the writer and is now convinced (in litt.) that the so-called *Aglaospora aculeata* Petch is not a phragmosporous fungus and it has no place in *Phragmodiaporthe.*

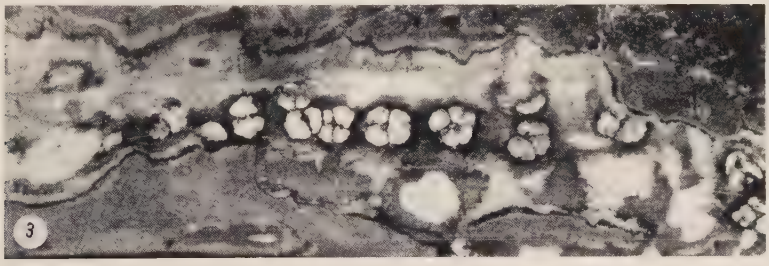



Fig. 3. *Tunstallia aculeata.* Perithecial cavities underneath the bark (× 4)

The fungus in question may be conveniently compared with *Cryptosporella* Sacc. and *Cryptospora* Tulasne which are characterized by unicellular ascospores and by a conical entostromatic disc about which the perithecia are aggregated circinately within the unaltered bark of the cortex with no marked differentiation of the entostromatic area or the dark marginal zone. The genus *Cryptospora* is similar in all respects to *Cryptosporella* except that the ascospores are long cylindrical instead of elliptical or fusoid. The fungus occurring in North-east India has got a very prominently developed ectostroma and a blackened marginal zone, characters that are not present in any species of *Cryptospora.* The morphology of the ascus and its apex is very different from *Cryptospora* or *Cryptosporella* and hence a new genus is proposed to accommodate the fungus causing the thorny stem blight of tea. The generic name is given after Mr. A. C. TUNSTALL erstwhile Mycologist of the Indian Tea Association who first reported the disease from North-east India.

**Tunstallia gen. nov.** *Perithecia* clustered, immersed erumpent, strongly stromatic, carbonaceous, aggregated in groups up to 5 in number with a prominent spinescent ectostroma and a well formed blackened marginal zone. Asci clavate to cylindrical, tetra- or octosporous, distinctly pedicellate with a truncate apex. Spores elongate fusoid, cymbiform or anguilliform, hyaline to subhyaline, continuous.

Perithecia gregaria vel fasciculata, erumpentia, stromatica, carbonacea, ectostroma spinosa prominente et margina astra. Asci clavati vel cylindracei, tetra- vel octospori, pedicellati, apice truncato. Sporae elongate fusiformes, cymbiformes vel anguilliformes, hyalines vel subhyalines, continuae.

***Tunstallia aculeata*** **(Petch) Agnihothrudu comb. nov. mutatis charct.**

Fructifications appearing on the surface of the bark as strongly pustulate, subspherical to acuminate swellings up to 2.5 mm in diam. Stroma immersed erumpent, well developed, dark carbonaceous, composed of hyphae and cortical tissues bound by a well developed dark, marginal zone enclosing a fascicle of confluent perithecia up to 5 in number with a common ostiolum opening into the spinescent conical apex of the ectostroma measuring up to 2 mm in height. Perithecia appearing as irregular, flattened, shallow cavities measuring up to 2500 by 600 $\mu$ in diameter — embedded in a black pseudoparenchymatous stroma. Asci clavate to cylindrical, paraphysate, somewhat narrow above with a truncate apex, typically pedicellate-pedicel straight or often recurved; tetrasporous measuring 148 to 240 $\mu$ by 22 to 44 $\mu$. Ascospores lying parallel in the ascus, elongate fusoid to cymbiform, one-celled, hyaline to subhyaline, guttulate, measuring 80 to 110 by 6 to 13 $\mu$.

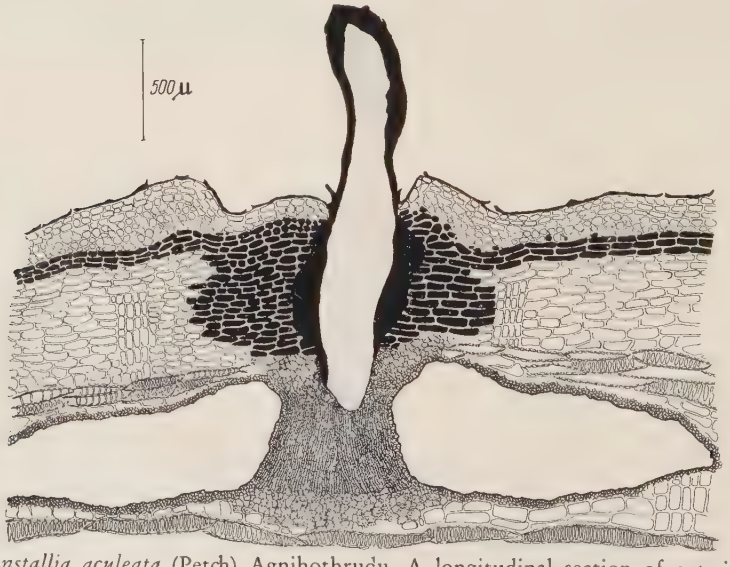



Fig. 4. *Tunstallia aculeata* (Petch) Agnihothrudu. A longitudinal section of a twig through the "Thorn" showing the neck, perithecial cavities and the stroma

Habit: On dead branches and stems of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, Ceylon and North-east India.

Two distinct forms could be recognized in the specimens examined by the writer. They were not found together on the same bush although they may occur in the same section of tea on different bushes. One has got consistently the tetrasporic asci with spores that are cymbiform, the mean length of the spores falling between 81 and 111 $\mu$. This is conveniently placed under *Tunstallia aculeata* (Petch) Agnihothrudu. The other form has octosporus asci with the spores that are anguilliform, the mean length of which falls between 116 and 152 $\mu$. This form has narrower spores and is herebelow described as a new variety.

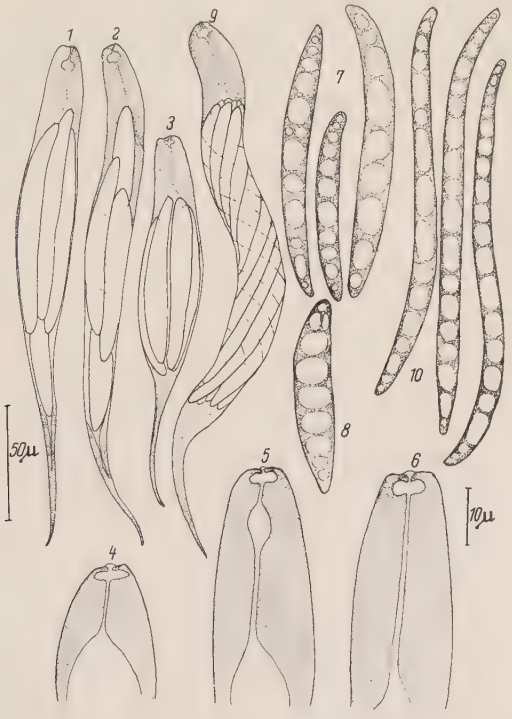



Fig. 5. 1—8: *Tunstallia aculeata* (Petch) Agnihothrudu. 1—3: The asci. 4—6: The apical apparatus of the ascus. 7 and 8: The ascospores. 9 and 10: *Tunstallia aculeata* (Petch) Agni. var. *Kesabii* Agnihothrudu. 9: The ascus with ascospores. 10: The ascospores

*Tunstallia aculeata* (Petch.) Agnihothrudu var. *Kesabii* nov. var.

Other characters being same, the asci are octosporous measuring 148 to 266 by 22 to 37 $\mu$; ascospores typically fasciculate, lying twisted parallely in the ascus, anguilliform, guttulate, measuring 100 to 162 by 6 to 12 $\mu$

Type on dead twigs of tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, Tumsong tea Estate, Darjeeling, West Bengal; coll. V. Agnihothrudu 29-IX-1959;

deposited in Herbarium Cryptogamie Indiae Orientalis and Mycological Herbarium, Tocklai Experimental Station, Cinnamara, Assam.

Asci octospori, 148—266 $\mu$ longitudine et 22—37 $\mu$ crassitudine. Ascosporae fasciculatae, paralleliter implicatae, anguilliformae, guttulatae, 100—162 $\mu$ longitudine et 6—12 $\mu$ crassitudine. In ramis emortuis Camelliae sinensis (L.) O. Kuntze.

The varietal name given is after Mr. KESAB CHANDRA SARMAH who is associated with the Mycology Branch of Tocklai Experimental Station for more than 40 years.

## Zusammenfassung

Die als „Thorny Stem Blight" bezeichnete Krankheit des Teestrauches tötet entweder einzelne Äste oder, sofern der Erreger in den Stamm eindringt, den ganzen Strauch. Der Erreger — ein Ascomycet, bisher bekannt unter dem Namen *Aglaospora aculeata* Petch — wird ausführlich beschrieben. Da er weder zur Gattung *Aglaospora* Ces. et de Not. noch zur *Phragmodiaporthe* Wehm. paßt, wird für ihn die neue Gattung *Tunstallia* Agnihothrudu aufgestellt. Gleichzeitig wird noch eine Varietät beschrieben.

## Acknowledgments

I am thankful to the Director, Tocklai Experimental Station, for permission to publish this paper, to Mr. K. C. SARMAH for his encouragement, to Prof. Dr. L. E. WEHMEYER of the University of Michigan, Ann Arbor., USA, for his comments on the local specimens, to the Director, Tea Research Institute, Ceylon and the Director, Kew Botanic Gardens for making available the type Collections of *Aglaospora aculeata* Petch. I am deeply indebted to Dr. EMIL MÜLLER, Konservator der Botanischen Sammlungen der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich for critically examining the specimens forwarded to him and offering valuable suggestions from time to time and for providing the Latin diagnosis of the new genus and the variety.

## References

PETCH, T., 1906: Descriptions of new Ceylon Fungi. Ann. R. bot. Gdns., Peradeniya **3**, 3.

TUNSTALL, A. C., 1940: Notes on Root Diseases of Tea. I. T. A. Memorandum No. 8.

— —, and K. C. SARMAH, 1947: Notes on Stem Diseases of Tea in North-East India. I. T. A. Memorandum No. 16.

WEHMEYER, L. E., 1941: *Pseudotrichia* and the new genus *Phragmodiaporthe*. Mycologia **33**, 54—63.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich und den Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge, Mass.*

# Zur Bildung eines mazerierenden Fermentes durch *Dothidea ribesia* Fr.[1])

von

St. Naef-Roth, E. Gäumann und P. Albersheim

*Mit 2 Abbildungen*

Inhalt: Einleitung. — 1. Kapitel. Isolierung und Wirkungsweise von Phytolysin. — 2. Kapitel. Isolierung und Wirkungsweise von Plowrightin. — 3. Kapitel. Kombination der Wirkung von Phytolysin und Plowrightin. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

## EINLEITUNG

In der Diskussion über die Wirkungsweise der von einem Parasiten in der befallenen Wirtspflanze produzierten Toxine wurde von verschiedenen Autoren auf die Rolle der ebenfalls vom Parasiten gebildeten Fermente hingewiesen, die in ähnlicher Weise wie die Toxine den Stoffwechsel der erkrankten Pflanze zu stören vermögen. Bei vielen Gefäßmykosen kann ein Einfluß von Pektinenzymen auf die Ausbreitung des Parasiten und auf die Manifestierung der Erkrankung angenommen werden. So vermuten beim Syndrom der Welkekrankheit der Tomaten Waggoner und Dimond (1955) sowie Gothoskar et al. (1953), daß neben den für *Fusarium lycopersici* Sacc. bisher bekannten Welketoxinen (Lycomarasmin, Lycomarasminsäure und Fusarinsäure) den ebenfalls vom Pilz in vitro und in vivo produzierten Pektinenzymen eine wesentliche Bedeutung zukommt. Zu ähnlichen Schlüssen kommen Heitefuss et al. (1960) nach Untersuchungen über die Bedeutung von pektolytischen Enzymen bei *Fusarium conglutinans* Woll. (cabbage yellows) und Laksminarayanan (1957) bei der Baumwollwelke, hervorgerufen durch *Fusarium vasinfectum* Atk., wo in Gewebehomogenaten erkrankter Baumwollpflanzen mit starken Welkesymptomen eine wesentlich höhere Pektinmethylesterase-Aktivität gefunden wurde als in gesunden Pflanzen.

1) Die vorliegende Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank wiederholen.

Neben Pektinenzymen finden HUSAIN und DIMOND (1960) in Kulturlösungen von *Fusarium lycopersici* Zellulase, der sie ebenfalls einen Einfluß auf die Pathogenese zuschreiben. Und in Übereinstimmung dazu findet TRIONE (1960) bei der Flachswelke, verursacht durch *Fusarium lini* neben Fusarinsäure Polygalacturonase und Zellulase im Kulturfiltrat des Pilzes. Enzyme scheinen also neben Toxinen eine Wirkung auf die Erkrankung zu haben.

Doch konnte ein klarer Zusammenhang zwischen der phytotoxischen Wirkung von Welketoxinen einerseits und pektolytischen oder zellulolytischen Enzymen andererseits noch nicht bewiesen werden, obwohl beide Stoffgruppen als Stoffwechselprodukte verschiedener Fusarien in vitro und zum Teil in vivo gefunden wurden.

Daß ein Parasit die Wirkung der von ihm produzierten Toxine in der Wirtspflanze durch Bildung entsprechender Fermente stark zu unterstützen oder überhaupt erst zu ermöglichen vermag, soll am Beispiel von *Dothidea ribesia* Fr. diskutiert werden.

Der für die folgenden Untersuchungen verwendete Stamm von *Dothidea ribesia* Fr. (E. T. H. Nr. M 2630) wurde von LOEFFLER (1957) aus lebenden Zweigen von *Ribes nigrum*, die typische Welkesymptome zeigten, — neben einer nicht näher beschriebenen *Stemphylium*-Art — isoliert. Der Pilz wurde von uns in verschiedenen Nährlösungen gezogen, und die Kulturfiltrate wurden auf ihre toxische Wirkung für Pflanzen und Mikroorganismen ausgetestet. Dabei fanden wir zwei ganz verschieden wirksame Prinzipien:

1. eine typisch mazerierende Wirkung auf pflanzliche Gewebe, für die ein hochmolekularer, wasserlöslicher, antibiotisch unwirksamer Eiweißstoff verantwortlich ist; wir möchten den Stoff wegen dieses lytischen Effektes vorläufig P h y t o l y s i n nennen, und

2. eine antibiotische Aktivität, die auf einen in organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser schwer löslichen Neutralkörper zurückzuführen ist, für den wir in Anlehnung an den für die hyalinsporigen *Dothidea*-Arten von SACCARDO (1883) verwendeten Gattungsnamen *Plowrightia* den Namen P l o w r i g h t i n vorschlagen.

## 1. KAPITEL

## ISOLIERUNG UND WIRKUNGSWEISE VON PHYTOLYSIN

1886 beschrieb DE BARY die Giftwirkung von *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Sacc. et Trott. auf Gewebe von Rüben, dessen Zellwände desorganisiert und dessen Protoplasten von den Pilzhyphen her abgetötet werden. Er fand im Preßsaft befallener Rüben und in der Myzeldecke des Pilzes ein mit Alkohol fällbares Ferment, das Rübendünnschnitte mazeriert, indem es die Zellwände zerstört und den Protoplasmakörper abtötet. Diese Mazerierung pflanzlicher Gewebe wird durch ganz verschiedene Mikroorganismen in vivo und zum Teil durch ihre zellfreien Kulturlösungen verursacht und wird allgemein der Anwesenheit von Pektinenzymen zugeschrieben. Denn viele dieser Organismen vermögen pektolytische Enzyme auszuscheiden,

und zwar Pektinmethylesterasen sowie Polygalacturonasen (Deuel und Stutz 1958). So produziert *Erwinia aroideae* (Town.) Holland, pathogen für Kartoffelknollen, in Kulturfiltraten auf Kartoffelsaft Enzyme, die Kartoffelgewebe mazerieren (Murant und Wood 1957). *Sclerotinia fructigena* Schroet., *Botrytis cinerea* Pers. und *Penicillium expansum* Link als bekannte Fäulniserreger produzieren in geeigneten Kulturmedien pektolytische Enzyme mit mazerierender Wirkung auf Apfelgewebe (Cole 1958). Tribe (1955) isolierte aus Kulturen von *Botrytis cinerea* Pers. und *Erwinia aroideae* Enzymfraktionen, die starke pektolytische Eigenschaften aufweisen, parenchymatische Gewebe höherer Pflanzen mazerieren und die Zellen des mazerierten Gewebeverbandes abtöten. Ferner gewann Kaji (1956, 1959) aus Kulturen einer Varietät des *Clostridium felsineum* (Carb. et Tomb.) Bergey et al. Enzympräparate, die die Pektine der Mittellamelle auflösen, sich jedoch durch Ionenaustauscher von PME und PG trennen lassen (Kaji und Anabuki 1958) und daher einem anderen Enzymtypus angehören.

Wie wir im folgenden zeigen möchten, kann aus Kulturen von *Dothidea ribesia* eine Enzymfraktion gewonnen werden, welche zwar pektinabbauende Fermente enthält, doch zur Hauptsache ein mazerierendes Prinzip verkörpert, das sich in Eigenschaften und Wirksamkeit von den bisher bekannten Pektinenzymen unterscheidet.

## § 1. Kulturbedingungen und Testmethoden

*Dothidea ribesia* (Stamm E. T. H. Nr. M 2630) wurde in Stand- und Schüttelkulturen auf verschiedenen Nährlösungen gezüchtet. Auf rein synthetischen Lösungen wie Raulin-Thom und Richard werden keine Toxine gebildet. Dagegen ergab die Verwendung von Knop-Nährlösung mit Zusatz von Zucker und verschiedenen organischen Extrakten wie Difco-Hefeextrakt, N-Z-Aminen und Distillers (wasserlöslicher Anteil der Maisschlempe aus Whiskyfabrikation) in Standkultur toxische Kulturfiltrate, wobei Knopsche Lösung mit Zusatz von Distillers und Mannit die besten Resultate lieferte.

Die Kulturfiltrate und Enzymtrockenpräparate wurden mit Tomatensprossen folgendermaßen ausgetestet:

Tomaten der Sorte Tuckswood werden im Glashaus gezogen, im 4-Blatt-Stadium geschnitten und in Kulturfiltrate bzw. Enzymlösungen verschiedener Verdünnungen gestellt (Philips Fluoreszenzlampen TL 25 W — 33, in 60 cm Abstand; 21 °C; 60 bis 70 % rel. Feuchtigkeit). Nach 6 Stunden werden die Sprosse in Brunnenwasser zurückgestellt, und nach weiteren 20 Stunden wird die Mazerierung des Tomatenstengelgewebes in fünf quantitativen Stufen (0 bis 4) bonitiert (Mittel von je vier Pflanzen):

0 keine Wirkung,
1 Stengel zu 1/4 mazeriert; Blätter wenig Randnekrosen,
2 Stengel zu 1/2 mazeriert; Blattstiele schlaff, Blätter nekrotisch,
3 Stengel zu 3/4 mazeriert; Blattstiele mazeriert, Blätter nekrotisch,
4 Stengel und Blattstiele total mazeriert; Blätter nekrotisch.

Eine Einheit $E_M$ besitzt diejenige Lösung, die an Tomaten eine Mazerierung der Stufe 2 auslöst; ein Kulturfiltrat, das in einer Verdünnung auf 1/20 an Tomatensprossen noch Mazerierung 2 auslöst, hat z. B. 20 $E_M$/ml, oder ein Enzymtrockenpräparat, das bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml die Mazerierungsfähigkeit 2 aufweist, besitzt 10 $E_M$/mg.

Ein Kulturversuch bei verschiedenen Inkubationstemperaturen zeigt (Tab. 1), daß 21 °C die günstigste Züchtungstemperatur ist, bei welcher vom 10. Tage an eine ziemlich hohe Phytolysinkonzentration in der Kulturlösung erscheint. Das Kulturfiltrat kann nach 13 bis 17 Tagen auf rund ein Zwanzigstel verdünnt werden, um noch eine Mazerierung an Tomatenstengeln von Stufe 2 auszulösen.

Eine weitere Versuchsreihe, dargestellt in Tabelle 2, klärt den Einfluß der Distillerskonzentration und zeigt, daß mit steigendem Distillersgehalt der Nährlösung (0,5 bis 2 %) die Phytolysinaktivität im Kulturfiltrat ansteigt. Höhere Konzentrationen ergeben keinen weiteren Anstieg. Der pH-Wert der Kulturlösungen steigt bei allen Nährlösungen der Tabelle 2 in ungefähr gleicher Weise mit der Kulturdauer von 4,5 bis 7,4.

Zur Produktion von aktivem Kulturfiltrat wurde der Pilz in der Folge auf Knop — Distillers 2 % - Mannit 2 % in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Nährlösung bei 21 °C inkubiert und die Kulturlösung nach 16 Tagen mit etwa 20 bis 30 $E_M$/ml geerntet.

*Tabelle 1*

Phytolysinkonzentration im Kulturfiltrat in Abhängigkeit von Inkubationstemperatur und Kulturzeit

| Kulturzeit Tage | Mazerierungsfähigkeit des Kulturfiltrates in $E_M$/ml nach Kultivierung bei | | |
|---|---|---|---|
| | 18 °C | 21 °C | 24 °C |
| 8 | 0,5 | 0 | 0 |
| 9 | 0,5 | 0,5 | 0 |
| 10 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 11 | 0,8 | 8 | 4 |
| 12 | 1 | 15 | 6 |
| 13 | 3 | 20 | 8 |
| 14 | 6 | 25 | 6 |
| 15 | 5 | 20 | 6 |
| 16 | 4 | 20 | 3 |
| 17 | 4 | 18 | 3 |
| 20 | 2 | 15 | 3 |

Die Enzymproduktion anderer *Dothidea*-Stämme wurde in gleicher Versuchsanordnung untersucht. Dabei fanden wir unter fünf weiteren *Ribesia*-Stämmen, die LOEFFLER von roten Johannisbeeren isolierte, einen Stamm (E. T. H. Nr. M 2726), der kein Phytolysin produzierte, während die vier übrigen (E. T. H. Nrn. M 2624, M 2626, M 2627, M 2727) das Enzym wohl ausscheiden, doch in viel geringerer Ausbeute.

An anderen *Dothidea*-Arten (LOEFFLER 1957) wurden geprüft:

E. T. H. Nr.

M 2599 *Dothidea Mülleri* Loeffler, isoliert von *Daphne striata*,

M 2598 *Dothidea berberidis* (Wahl.) De Not., isoliert von *Berberis vulgaris*,

M 2692 *Dothidea hippophaëos* (Pass.) Fuck., isoliert von *Hippophaë rhamnoides*,
M 2730 *Dothidea insculpta* Wallr., isoliert von *Clematis vitalba*,
M 2725 *Dothidea Mezerei* Fr., isoliert von *Daphne Mezereum*.

Alle fünf Stämme bilden in Kulturen kein Phytolysin. Die Enzymproduktion ist beschränkt auf die einzige parasitische Art der Gattung, nämlich *Dothidea ribesia*.

*Tabelle 2*

Phytolysinkonzentration im Kulturfiltrat in Abhängigkeit von der Distillerskonzentration

$E_M$/ml Kulturfiltrat nach Kultivierung bei 21 °C

| Kulturzeit Tage | pH-Wert des Kulturfiltrates | Distillers Konzentration | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0,5 % | 1 % | 2 % | 3 % | 4 % |
| 8 | 4,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 4,6 | 2 | 10 | 5 | 5 | 0 |
| 12 | 5,4 | 5 | 12 | 20 | 5 | 5 |
| 14 | 6,5 | 17 | 25 | 20 | 15 | 15 |
| 16 | 6,6 | 20 | 20 | 25 | 25 | 20 |
| 18 | 6,7 | 15 | 25 | 30 | 30 | 25 |
| 20 | 6,8 | 5 | 10 | 25 | 30 | 30 |
| 24 | 6,8 | 0 | 10 | 30 | 30 | 30 |
| 28 | 7,0 | 0 | 4 | 25 | 10 | 30 |
| 32 | 7,3 | 0 | 0 | 20 | 20 | 30 |
| 40 | 7,4 | 0 | 0 | 20 | 10 | 20 |

## § 2. Aufarbeitung und chemisch-physikalische Eigenschaften des Phytolysins

### a) Gewinnung von Trockenpräparaten aus der Kulturlösung

Das mazerierende Prinzip ist nicht adsorbierbar an Asmit und Wolfatit, gut adsorbierbar an Duolit, kann jedoch aus letzterem nicht mehr eluiert werden. Bei Fällung mit Ammonsulfat und Kochsalz lassen sich inaktive Niederschläge gewinnen. Bei Versetzen des Kulturfiltrates mit Aceton fällt ein gut aktiver Niederschlag aus. Daher wird zur Gewinnung von Phytolysin das Kulturfiltrat bei unverändertem pH (6,4 bis 6,6) mit steigenden Mengen Aceton versetzt. Die Lösung wird bei 0 °C 4 Stunden stehengelassen, der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und die Lösung mit weiterem Aceton versetzt. Der Vorgang wird wiederholt, bis keine Niederschläge mehr anfallen. Die einzelnen Niederschläge werden mit dem entsprechenden Aceton-Wasser-Gemisch, bei welchem sie unlöslich werden, gewaschen und lyophilisiert. Die Ausbeuten der mit steigendem Acetonzusatz anfallenden Niederschläge sind für 4 einzeln getestete Versuche in Tabelle 3 zusammengestellt.

Bei einem Acetongehalt von 33 % fällt je Liter Kulturfiltrat etwa 1 g inaktive Substanz aus. Steigt der Acetongehalt auf 45 %, so fallen weitere

etwa 200 mg/l mit total 400 $E_M$ an. Die beste Ausbeute wird bei 50 % und 55 % Aceton erreicht (180 mg/l mit total 2300 $E_M$ bzw. 130 mg/l mit total 1300 $E_M$). Bei weiterem Zusatz von Aceton fallen nur noch inaktive Substanzen aus.

Die höchsten Aktivitäten finden sich bei den Niederschlägen von 50 % und 55 % Aceton (13 bzw. 10 $E_M$/mg). Die so gewonnenen Trockenpräparate bewirken also in Konzentrationen von 75 $\gamma$/ml bzw. 100 $\gamma$/ml eine Mazeration des Tomatenstengelgewebes von Stufe 2. Ihre Wirkungsgrenze, bestimmt auf Grund der Auslösung einer knapp feststellbaren Mazeration der Stengelbasis, liegt bei 10 bis 30 $\gamma$/ml.

*Tabelle 3*

Gesamtausbeute an Phytolysin bei fraktionierter Fällung mit Aceton

Menge und Gesamtaktivität der Trockenpräparate je Liter Kulturfiltrat nach fraktionierter Fällung mit Aceton

| % Aceton | 33 | | 45 | | 50 | | 55 | | 60 | | 65 | | 70 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | mg | $E_M$ | mg | $E_M$ | mg | $E_M$ | mg | $E_M$ | mg | $E_M$ | mg | $E_M$ | mg |
| Versuch I | 1120 | 0 | 355 | 350 | 200 | 3200 | 160 | 1300 | 150 | 150 | 110 | 0 | 0 |
| Versuch II | 1530 | 0 | 200 | 200 | 170 | 1350 | 110 | 900 | 60 | 120 | 10 | 0 | 0 |
| Versuch III | 1250 | 0 | 125 | 250 | 260 | 2600 | 190 | 1900 | 100 | 100 | 70 | 0 | 0 |
| Versuch IV | 600 | 0 | 100 | 800 | 90 | 2000 | 50 | 1000 | 90 | 90 | 65 | 0 | 0 |
| Mittelwerte | 1125 | 0 | 195 | 400 | 180 | 2300 | 130 | 1300 | 100 | 115 | 65 | 0 | 0 |

**b) Einfluß von pH-Wert und Temperatur auf die Aktivität des Phytolysins**

Das Wirkungsoptimum von Phytolysin wird im Tomatentest bei einem pH-Wert der Testlösungen von 5 bis 7 erreicht. Tiefere und höhere pH-Werte schädigen das Enzym irreversibel, und zwar nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten, nach welchen der pH-Wert wiederum auf 6 (wie bei der unveränderten Kontrolle) eingestellt wurde.

*Tabelle 4*

Desaktivierung von Phytolysin durch Erwärmen

| Einwirkungszeit Minuten | Phytolysinaktivität in Prozent der 0°-Kontrolle | | |
|---|---|---|---|
| | 30 °C | 40 °C | 50 °C |
| 5 | 100 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 100 | |
| 15 | — | 100 | |
| 20 | 100 | 75 | |
| 30 | 75 | 25 | |
| 40 | — | 10 | |
| 50 | — | 0 | |
| 60 | 50 | | |
| 120 | 50 | | |
| 360 | 25 | | |

Durch Temperaturen von 50 °C und mehr wird Phytolysin sofort zerstört; es erträgt jedoch Temperaturen von 40 °C während kurzer Zeit (15 Min.) und wird bei 30 °C nur langsam desaktiviert, d. h. die Aktivität fällt in 2 Stunden auf 50 %, in 6 Stunden auf 25 % der Kontrolle (Tab. 4).

### c) Das Verhalten des Phytolysins bei Dialyse

Die Lösung eines Phytolysinpräparates mit 10 $E_M$/mg wird in der Konzentration von 75 mg in 15 ml Wasser in einen Zellophanschlauch (Umfang 54 mm, Länge 15 cm) eingefüllt, der vorher genau auf seine Dichtigkeit geprüft worden war. Die Membran wird außen mit 40 ml bidest. Wasser umgeben und zu 0 °C gestellt. Dabei verliert die Innenlösung mit zunehmender Dialysierzeit an Aktivität, während in der Außenlösung keine mazerierende Wirkung auf Tomatenstengel gefunden werden kann (Tab. 5).

*Tabelle 5*

Einfluß der Dialysierzeit auf die Aktivität der dialysierten Phytolysinlösung

| Dialysezeit Stunden | Phytolysinaktivität in Prozent der 0 °-Kontrolle | |
|---|---|---|
| | innen | außen |
| 10 | 40 | 0 |
| 20 | 30 | 0 |
| 30 | 10 | 0 |
| 40 | 8 | 0 |
| 70 | 2 | 0 |

Wird die Dialyse nach 72 Stunden abgebrochen und die Außenlösung sehr schonend am Wasserstrahlvakuum zur Trockene eingedampft, so kann die Aktivität der Innenlösung durch Zusatz der Außensubstanzen zur Innenlösung wiederum erhöht werden (Tab. 6). Die Trokkenrückstände der Außenlösungen betragen zwischen 18 % und 28 % der total eingesetzten Substanzmenge.

*Tabelle 6*

Reaktivierung des dialysierten Phytolysins durch Wiedervereinigung der beiden Komponenten (Innen + Außen 1 : 1 = anfängliche Konzentration; drei parallele Versuche)

| Getestete Lösungen | Phytolysinaktivität in Prozent der 0 °-Kontrolle | | |
|---|---|---|---|
| | Versuch I | Versuch II | Versuch III |
| Innen (1 mg/ml) ..... | 12 | 10 | 15 |
| Außen (5 mg/ml) ..... | 0 | 0 | 0 |
| Innen- + Außenlösung 1 : 1 .. | 30 | 70 | 60 |
| Innen- + Außenlösung 1 : 2 .. | 40 | 100 | 100 |
| Innen- + Außenlösung 1 : 4 .. | 60 | 120 | 150 |

Das Verhalten von Phytolysin bei Dialyse an Zellophanmembranen scheint auf das Vorhandensein eines Coenzymes hinzuweisen, das durch Dialyse abtrennbar ist, bei welchem es sich jedoch um eine labile Komponente handeln dürfte. Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wird der aktivierende Faktor in der Außenlösung durch Erhitzen beeinträchtigt. Kochen der Außenlösung während einer Minute läßt die Reaktivierung der Innenlösung auf nur 75 % der Kontrolle ansteigen (nicht erhitzte Außenlösung 150 % der Kontrolle) und 15 Minuten bei 100 °C ermöglicht eine Reaktivierung auf nur 50 % der Kontrolle. Der Faktor wird also durch Erhitzen zu zwei Drittel zerstört. Er kann an Kohle adsorbiert werden.

Bis jetzt gelang es jedoch nicht, die wirksame Gruppe zu isolieren. Versuche zur Reaktivierung der dialysierten Innenlösung wurden mit bekannten Coenzymen wie ATP, DPN, ITP, CoA, mit den Vitaminen $B_{12}$ und C, mit Heteroauxin und mit verschiedenen Kationen durchgeführt, alle Versuche mit negativem Resultat. Weitere Versuche mit gereinigten Präparaten sind notwendig, um die aktive Gruppe näher zu definieren.

*Tabelle 7*

Einfluß kurzer Erwärmung auf die Reaktivierungsfähigkeit der Außenlösung

| Getestete Lösungen | Vorbehandlung der Außenlösung | Phytolysinaktivität in Prozent der Kontrolle |
|---|---|---|
| Innen ..... | | 15 |
| Außen ..... | | 0 |
| Innen- + Außenlösung 1 : 4 .. | keine | 150 |
| Innen- + Außenlösung 1 : 4 .. | 1 Minute 100 °C | 75 |
| Innen- + Außenlösung 1 : 4 .. | 15 Minuten 100 °C | 50 |
| Innen- + Außenlösung 1 : 4 .. | Durchlauf der an Kohle adsorbierten Außenlösung | 10 |

**d) Inhibitoren und Aktivatoren**

Phytolysinlösungen von 10 $E_M$/ml wurden mit verschiedenen Inhibitoren (Na-arsenat, 2,4-Dinitrophenol, Na-azid, KJ), mit Komplexon III (EDTA), sowie mit einer Reihe von Kationen versetzt, und darauf ihre Aktivität im Tomatentest geprüft. Von den geprüften Inhibitoren zeigen nur Na-azid und KJ $10^{-4}$ molar eine leichte Hemmwirkung auf 75 % bzw. 50 % der Kontrolle. Die Prüfung der Kationenzusätze ergab nach Tabelle 8 eine stark hemmende Wirkung von Ag, Pb und vor allem von Al.

*Tabelle 8*

Die Wirkung von Kationenzusätzen auf die Phytolysinaktivität

| Zusatz | Phytolysinaktivität in Prozent der Kontrolle | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Molare Konzentration | | | | | |
| | $5 \cdot 10^{-3}$ | $10^{-3}$ | $5 \cdot 10^{-4}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ |
| Na | 100 | | | | | |
| Ca | 100 | | | | | |
| Co | 100 | | | | | |
| Mg | 37 | 100 | | | | |
| Cu | 50 | 100 | | | | |
| $Fe^{+++}$ | | 75 | 100 | | | |
| $Fe^{++}$ | | 75 | 100 | | | |
| Mn | | 50 | 75 | 100 | | |
| Ag | | 30 | 37 | 50 | 100 | |
| Pb | | 20 | 20 | 50 | 100 | |
| Al | | 19 | 25 | 37 | 37 | 100 |

Komplexon III vermindert die Aktivität $10^{-2}$ molar auf 25 %, $10^{-3}$ molar auf 44 % (Tab. 9). Also dürfte für die Wirkung des Enzyms unter anderem auch ein oder mehrere Metalle eine Rolle spielen. Da Komplexon III die Aktivität wesentlich herabsetzt, andererseits die Kationen Ca, Na und Co keine Hemmung hervorrufen, lag es nahe zu prüfen, ob mit Zusatz von Komplexon III und einem Überschuß an Ca, Na oder Co die Hemmwirkung des Komplexons aufgehoben werden kann. Tabelle 9 zeigt, daß durch Na die Komplexonhemmung aufgehoben, durch Ca und Co die Wirkung gesteigert wird.

*Tabelle 9*

Die Wirkung von Komplexon III allein und in Kombination mit Kationenüberschüssen auf die Phytolysinaktivität
(Mittel aus drei Versuchen)

| Zusätze (molare Konzentration) | | Phytolysinaktivität in Prozent der Kontrolle |
|---|---|---|
| Komplexon III | Kation | |
| $10^{-2}$ | 0 | 25 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | 0 | 32 |
| $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ | 0 | 31 |
| $10^{-3}$ | 0 | 44 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ | 0 | 75 |
| $10^{-4}$ | 0 | 100 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | Co $10^{-2}$ | 250 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | $5 \cdot 10^{-3}$ | 200 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ | 200 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | Ca $10^{-2}$ | 200 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | $5 \cdot 10^{-3}$ | 200 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ | 200 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | Na $10^{-2}$ | 100 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | $5 \cdot 10^{-3}$ | 100 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ | $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ | 100 |

Ein Vergleich von Phytolysin mit pektolytischen und zellulolytischen Enzymen läßt folgende Schlüsse zu:

1. Die bisher aktivsten Phytolysinpräparate mazerierten Tomatenstengelgewebe bis zu Konzentrationen von 10 bis 30 $\gamma$/ml. (Weder feiner abgestufte Acetonfällung noch Veränderung des pH-Wertes bei der Fällung führen zu aktiveren Präparaten.) Die Fraktionen vermögen Pektin abzubauen (Abbauzahl für Pektin bei Phytolysin mit 10 $E_M$/mg etwa 80, bei Pektinase N. B. C. 100); doch enthalten sie noch Verunreinigungen, denen wir das Pektinabbauvermögen zuschreiben.

2. Da auf Grund der mazerierenden Wirkung die Vermutung nahe liegt, daß es sich bei den vorliegenden Trockenpräparaten um pektin- oder zelluloseabbauende Fermente handeln könnte (Pektinesterasen, Polygalacturonasen, Protopektinasen, Arabanase oder Zellulase) wurden drei verschiedene

Enzympräparate in ihrer Wirkung auf Tomatenstengelgewebe geprüft, nämlich Hydralase, Pektinase N.B.C. und Arabanase. Alle drei Vergleichspräparate vermögen die typische Mazeration am Tomatengewebe auch in hohen Konzentrationen nicht auszulösen.

3. Phytolysin wird durch EDTA und Schwermetalle gehemmt, durch Überschuß an Co und Ca aktiviert und benötigt einen Cofaktor, hat also andere Eigenschaften als die bisher bekannten Pektinasen (DIXON und WEBB 1960, DEUEL und STUTZ 1958). Wie im folgenden gezeigt werden soll, ist auch die biologische Wirkung deutlich von derjenigen der Pektinasen verschieden.

## § 3. Die biologische Wirkung des Phytolysins

Die spezifische mazerierende Wirkung von Phytolysin erstreckt sich auf nahezu alle bisher untersuchten, nicht verholzten pflanzlichen Gewebe. Blätter, Stengel und Wurzeln von 28 verschiedenen Phanerogamenarten aus 14 Familien werden nach Einlegen in Phytolysinlösungen von 100 $\gamma$/ml in 24 Stunden in ihrer Struktur so verändert, daß die Gewebe zerfallen und ein schleimiges Aussehen erhalten. Gleiche Wirkung haben Phytolysinlösungen, die in den Stengel von eingetopften intakten Tomatenpflanzen injiziert werden. Nicht angegriffen werden Gramineen (Hafer und Mais).

Das Enzym scheint den Gewebeverband zu zerstören; es mazeriert Kartoffelgewebe in ähnlicher Weise wie die pektolytischen Enzyme (TRIBE 1955, KAJI 1958, MCCLENDON und SOMERS 1960), ist jedoch nach Wirkungsspektrum und biochemischen Eigenschaften zu schließen nicht identisch mit Pektinasen oder Protopektinase. Das Substrat ist noch unbekannt. Um dieser Frage näher zu kommen, wurde versucht, die Wirkung auf einzelne Zellen zu klären.

Da Phytolysin auf Bakterien (*Staphylococcus aureus, B. subtilis, E. coli*) und auf Pilze (*Saccharomyces cerevisiae, Candida vulgaris, Ustilago sphaerogena*) keine Wirkung ausübt, wurde sein Einfluß auf die Beweglichkeit von Amöben, Paramaecien und *Chlamydomonas* und auf das Plasmolysierungsvermögen von *Spirogyra* untersucht.

### a) Die Wirkung des Phytolysins auf die Beweglichkeit von Protozoen und Grünalgen

Auf *Amoeba proteus*, die wir in Reinkultur aus dem Institut von Herrn Prof. ULRICH (E.T.H. Zürich) erhalten haben, wirkt Phytolysin auch nach einer Testdauer von mehr als 24 Stunden und in hohen Konzentrationen nicht ein; höchstens eine vorübergehende Abkugelung der Zelle ist zu beobachten.

Paramaecien verlieren unter Einfluß von Phytolysin ihre Beweglichkeit, sterben jedoch nicht ab. In hängenden Tropfen bei 21 °C sinkt die Beweglichkeit in 6 Stunden auf 10 % (Tab. 10); doch werden relativ hohe Enzymkonzentrationen benötigt, um die Geißeln zu immobilisieren.

Auch die Grünalge *Chlamydomonas eugametos* Moewus wird durch Phytolysin in Konzentrationen von 0,5 mg/ml nicht abgetötet (totale Wachstumshemmung erst bei 2 mg/ml). Sie vermehrt sich im Verdünnungsreihentest (beschrieben bei GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN 1960) wie in unbehandelten Kontrollen. Doch verlieren die Algenzellen ihre Beweglichkeit analog zu den Paramaecien, allerdings bei geringeren Konzentrationen (Tab. 11). Nach 8 Stunden in Phytolysinlösungen von 0,1 mg/ml ist noch die Hälfte der Zellen in Bewegung. Auch bei diesem Objekt scheint das Enzym in niedrigen Konzentrationen eine Wirkung auf die Geißeln auszuüben, jedoch die Zellwand nicht anzugreifen.

*Tabelle 10*

Der Einfluß von Phytolysin auf die Beweglichkeit von Paramaecien

| Phytolysinkonzentration mg/ml | Bewegliche Paramaecien in Prozent der Kontrolle nach Stunden | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 4 | 100 | 58 | 29 | 10 | 9 | 9 |
| 2 | 100 | 90 | 85 | 34 | 35 | 30 |
| 1 | 100 | 95 | 90 | 81 | 80 | 82 |

**b) Die Wirkung des Phytolysins auf die Plasmamembran von *Spirogyra nitida***

Die Vermutung, daß nicht die Zellwand oder die Mittellamelle angegriffen werden, sondern die Plasmamembran, führte zu Untersuchungen über die Wirkung des Enzyms auf das Plasmolysierungsvermögen pflanzlicher Protoplasten. Die Fähigkeit zur normalen Plasmolyse müßte in diesem Fall durch das Enzym herabgesetzt werden, so daß der prozentuale Anteil plasmolysierender Zellen nach Einwirkung von Phytolysin wesentlich unter dem Kontrollwert nicht behandelter Protoplasten liegen müßte.

Da sich *Spirogyra nitida* (Dillwijn) Link als günstiges Objekt für solche Untersuchungen erwiesen hat (BACHMANN 1956), wurden *Spirogyra*-Fäden

*Tabelle 11*

Die Wirkung von Phytolysin auf die Beweglichkeit von *Chlamydomonas*

| Phytolysinkonzentration mg/ml | Bewegliche Algenzellen in Prozent der Kontrolle nach | |
|---|---|---|
| | 6 Stunden | 8 Stunden |
| 1 | 22 | 20 |
| 0,5 | 36 | 35 |
| 0,25 | 64 | 35 |
| 0,1 | 72 | 45 |
| 0,05 | 82 | 70 |
| 0,025 | 90 | 85 |

30 und 60 Minuten in Phytolysinlösungen verschiedener Konzentration eingelegt, dann in 0,8 molarer Saccharoselösung während 30 Minuten plasmolysiert; anschließend wurde der Prozentsatz plasmolysierter Zellen von je 300 Zellen eines Algenfadens bestimmt.

*Tabelle 12*

Die Wirkung von Phytolysin auf die Plasmolysierbarkeit von *Spirogyra*-Protoplasten

| Einwirkungszeit des Phytolysins Min. | Anzahl plasmolysierter Zellen in Prozent der Kontrolle Phytolysinkonzentration in mg/ml | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,05 | 0,025 |
| 60 | 32 | 44 | 40 | 53 | 62 | 88 | 103 |
| 30 | 57 | 70 | 70 | 61 | 81 | 94 | 102 |

Tabelle 12 zeigt einen deutlichen Einfluß auf die Plasmolysierbarkeit der Algenzellen, der sich bei längerer Einwirkungszeit des Enzyms wesentlich verstärkt und bis zu Konzentrationen von 50 $\gamma$/ml feststellbar ist.

Wenn das Enzym nicht Zellwand oder Mittellamelle, sondern die Plasmamembran angreift, wie nach diesen Plasmolyseversuchen zu schließen ist, so muß es seine Wirkung auch auf schon plasmolysierte Protoplasten ausüben. Es muß also, zum Plasmolyticum zugegeben, die Plasmolyse mit der Zeit aufheben. Dazu folgender Versuch:

*Spirogyra*-Fäden werden 30 Minuten in einer 0,8 molaren Saccharoselösung plasmolysiert. Dann werden sie in verschieden konzentrierte Lösungen von Phytolysin plus 0,8 molarer Saccharose verschieden lang eingelegt und die Anzahl gut sichtbar plasmolysierter Zellen in einem Algenfaden nach verschiedenen Zeiten ausgezählt (Tab. 13).

*Tabelle 13*

Die Aufhebung der Plasmolyse von *Spirogyra*-Protoplasten durch Zusatz von Phytolysin zum Plasmolyticum

| Phytolysin-konzentration mg/ml | Anzahl plasmolysierter Zellen nach Minuten | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 60 |
| 20 | 154 | 123 | 93 | 40 | 30 |
| 10 | 250 | 232 | 182 | 111 | 88 |
| 5 | 120 | 110 | 100 | 81 | 67 |
| 2,5 | 264 | 202 | 180 | 150 | 93 |
| 1 | 101 | 86 | 67 | 54 | 56 |
| 0 | 209 | — | — | — | 209 |
| Pektinase N.B.C. 20 mg/ml | 186 | 185 | 185 | 182 | 164 |

Mit zunehmender Konzentration und zunehmender Einwirkungszeit des Phytolysins wird also die Plasmolyse der *Spirogyra*-Zellen im Plasmolyticum aufgehoben: Konzentrationen von 20 mg je ml zerstören die Plasmagrenzschicht in etwa 80 % der Zellen, bei 10 bis 1 mg Phytolysin je ml fällt der Prozentsatz auf etwa 30 bis 50 %. Pektinase N.B.C. hat auch in hohen Konzentrationen keinen derartigen Effekt.

Der Vorgang kann unter dem Mikroskop verfolgt werden: Wird der hypertonischen Lösung das Enzym in hohen Konzentrationen zugesetzt, so beginnt schon nach wenigen Minuten in den ersten plasmolysierten Zellen das Plasmalemma zu platzen; das Zytoplasma tritt an einer Stelle aus und verfärbt sich bräunlich (Abb. 1 b). In einer weiteren Versuchsreihe (10 mg Phytolysin je ml) platzen in den ersten 15 Minuten 32 % der plasmolysierten Protoplasten, in 55 Minuten 65 %, während 60 Minuten nach Zusatz von 20 mg Pektinase je ml nur 3 % geplatzte Membranen festzustellen sind. In keinem Falle wurden unter dem Einfluß von Phytolysin die Zellwände angegriffen, sie bleiben intakt.

Abb. 1. Der Einfluß von Phytolysin auf das Verhalten plasmolysierter Protoplasten von *Spirogyra nitida* (Dillw.) Link. a) plasmolysierte *Spirogyra*-Zellen. b) *Spirogyra*-Zellen, die im Plasmolyticum während 5 Min. der Wirkung von Phytolysin ausgesetzt worden sind. × Das Zytoplasma ist an einer Stelle ausgetreten und verfärbt sich dunkel. Vergr. etwa 600×

Werden die Algenfäden nach 60 Minuten in Wasser zurückgebracht, so erscheinen bis zur Phytolysinkonzentration von 5 mg/ml alle Zellinhalte desorientiert, koaguliert, zerstört. Bei 2,5 mg/ml scheinen in Wasser nur 2 % der plasmolysierten Zellen, bei 1 mg/ml 17 % normal zu deplasmolysieren. Inwiefern die Zellen nach der Enzymbehandlung noch lebensfähig sind, muß

in weiteren Versuchen mit gereinigten Präparaten geklärt werden. Sicher steht fest, daß der Anteil der in Wasser normal deplasmolysierenden Zellen von 95 % (Kontrolle) und 92 % (bei Zusatz von Pektinase) nach Einwirkung von 1 ‰ Phytolysin auf 17 % abfällt.

Falls sich diese lytische Wirkung auf das Plasmalemma pflanzlicher Zellen mit reinem Phytolysin bestätigen läßt, kann eine klarere Einsicht in die Vorgänge bei der Mazerierung pflanzlicher Gewebe durch Pektinenzyme gewonnen werden; denn es besteht die Möglichkeit, daß Spuren von Phytolysin in den von parasitischen Pilzen gewonnenen Pektinasepräparaten enthalten sind. Anhaltspunkte hierzu geben z. B. die Versuche von WOOD und GUPTA (1958), die in Kulturen von *Pythium de Baryanum* Hesse auf Kartoffelbrei ein Enzym vermuten, das Pektate nicht anzugreifen vermag, jedoch Mazerierung auslöst, also eventuell nicht die Mittellamelle direkt, sondern schützende Proteine angreift.

Phytolysin zerstört die Plasmagrenzschicht, scheint dadurch die mannigfachen Enzyme des Zytoplasmas und eventuell die Säuren der Vakuole freizumachen, so daß sie in ihrer kombinierten Wirkung den Zellverband eines pflanzlichen Gewebes aufzulösen vermögen und dadurch die Mazeration einleiten.

Es unterscheidet sich in der Wirkung deutlich von den Lysozymen (TOMCSIK und GUEX-HOLZER 1952), die eine Lyse bei verschiedenen Bakterien hervorrufen, jedoch nicht das Plasmalemma, sondern die Kapselsubstanzen angreifen und in Untersuchungen von WEIBULL et al. (1959) nur in der Wandfraktion von *Bacillus megaterium* gefunden werden konnten.

Phytolysin kann wertvoll sein als schonendes Aufschlußmittel für pflanzliche Zellen zur Gewinnung von Fermenten und subzellulären Partikeln, ferner zur Unterscheidung von verschiedenen Zellmembranen, da es nur die Gewebe von grünen Pflanzen angreift und gegenüber Pilzen, Bakterien und Amoeben unwirksam ist.

## 2. KAPITEL

## ISOLIERUNG UND WIRKUNGSWEISE VON PLOWRIGHTIN

Neben Phytolysin scheidet derselbe Stamm von *Dothidea ribesia* Fr. einen antibakteriell wirksamen Stoff ins Kulturfiltrat aus, der noch nicht rein dargestellt werden konnte, und den wir als Plowrightin bezeichnen möchten.

### § 1. Kulturbedingungen und Testmethode

Der Pilzstamm E. T. H. Nr. M 2630 wird zur Produktion von Plowrightin auf derselben Nährlösung gezüchtet wie für Phytolysin. Doch werden die Kulturen in 10-Liter-Gefäßen mit je 5 Liter Nährlösung bei 24 °C unter ständiger Belüftung geschüttelt.

Im Direkttest der Kulturlösung kann nur spurenweise Aktivität gegenüber Bakterien festgestellt werden. Für die Austestung werden je 300 ml

Kulturfiltrat mit gleicher Menge Essigester extrahiert; der Trockenrückstand wird in Aceton gelöst, auf Filterscheiben aufgezogen und im Plattentest mit

*Staphylococcus aureus*
*Bacillus subtilis*
*Escherichia coli*
*Ustilago sphaerogena*
*Saccharomyces cerevisiae*
*Candida vulgaris*

geprüft. Der Aktivitätsverlauf ist in Tabelle 14 aufgezeichnet.

### § 2. Extraktion und antibakterielle Wirkung des Plowrightins

Die Kulturen werden nach 5 bis 6 Tagen geerntet; das Myzel wird abgetrennt und die Lösung bei einem pH-Wert von 6,5 mit gleicher Menge Essigester dreimal extrahiert. Der Extrakt wird am Vakuum bei 30 bis 40 °C zur Trockene eingedampft und zur Aktivitätsbestimmung in Aceton gelöst.

*Tabelle 14*
Die Produktion von Plowrightin im Kulturfiltrat in Funktion der Kulturzeit

| Kulturzeit Tage | pH-Wert im Kulturfiltrat | Essigester-Trocken-rückstand von 300 cc KF mg | Grenze der Hemmwirkung im Plattentest mg/ml Aceton | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | *St. aur.* | *B. subt.* | *U. sphaerog.* |
| 2 | 4,8 | 172 | 20 | 20 | 5 |
| 3 | 5,1 | 89 | 20 | 20 | 10 |
| 4 | 5,7 | 49 | 20 | 20 | 5 |
| 5 | 6,3 | 23 | 2,5 | 1 | 0,5 |
| 6 | 6,4 | 21 | 5 | 2,5 | 1 |
| 7 | 6,4 | 20 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| 9 | 6,6 | 17 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| 10 | 7,0 | 10 | 10 | 10 | 5 |

Die besten Aktivitäten werden nach einer Kulturzeit von 5 Tagen erhalten. Der Essigesterrohextrakt hemmt *Ustilago* in einer Konzentration bis zu 0,5 mg/ml (*B. subtilis* 1 mg/ml, *Staphylococcus aureus* 2,5 mg/ml), ist für *E. coli, S. cerevisiae* und *C. vulgaris* auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch und für Pflanzen unwirksam.

Der Stoff ist chemisch noch nicht näher untersucht. Er wurde von Dr. W. Keller-Schierlein (Organisch-chemische Laboratorien der Eidg. Techn. Hochschule in Zürich) gereinigt und auf das Fünffache angereichert. Dieses Präparat wurde für unsere Versuche über das Zusammenwirken von Phytolysin und Plowrightin in der Pflanze verwendet. Seine Hemmwirkung gegen-

über *Ustilago sphaerogena* ist bis zu Konzentrationen von 0,1 mg/ml feststellbar. Auch das angereicherte Präparat löst an Tomatensprossen keine Schädigungen aus.

## 3. KAPITEL

## KOMBINATION DER WIRKUNG VON PHYTOLYSIN UND PLOWRIGHTIN

Da Phytolysin in sehr kleinen Dosen die Plasmamembran pflanzlicher Zellen angreift, so stellt sich die Frage, ob das Ferment in Kombination mit pilzlichen Toxinen schwerere Schädigungen in der Pflanze auslöst als jede Komponente für sich allein. Das Enzym würde als Wegbereiter für die nachfolgenden Toxine im Sinne des „spreading"-Effektes der Hyaluronidasen wirken. Diese Fermente spalten Hyaluronsäure, eine Kittsubstanz der Bindegewebsfibrillen, und ermöglichen oder erleichtern dadurch das Vordringen intra- oder subkutan applizierter Stoffe; dadurch wird es z. B. an und für sich harmlosen hyaluronidasehaltigen Bakterien in einer Mischinfektion möglich, als Wegbereiter für pathogene Keime zu agieren, die das Ferment nicht besitzen (AMMON und DIRSCHERL 1959).

In der folgenden Versuchsanordnung wurden unterschwellige Dosen von Phytolysin an Tomatensprosse verabreicht und die so behandelten Pflanzen mit Plowrightin vergiftet: Die Tomaten wurden in verschieden konzentrierte Lösungen (0,5 bis 0,1 mg/ml) von Phytolysin gestellt, bis sie die gewünschte Dosis des Fermentes (10 bis 100 mg/kg) aufgenommen hatten (30 bis 180 Min.). Anschließend wurden alle Pflanzen in eine Lösung von 1 mg/ml Plowrightin gestellt und so lange darin belassen, bis sie die Dosis von 150 mg/kg Tomatenfrischgewicht aufgenommen hatten (etwa 6 Stunden).

Nach 24 Stunden wurden die Schädigungen der einzelnen Pflanzen bonitiert. Die Kontrollpflanzen, denen nur Plowrightin verabreicht worden war, zeigten keine Schäden.

Phytolysin allein löste in den Dosen von 50, 75 und 100 mg/kg eine geringe Mazeration des untersten Stengelteils aus (Abb. 2, III). Diejenigen Pflanzen jedoch, denen nach dem Phytolysin zusätzlich 150 mg/kg Plowrightin verabreicht wurde, wiesen mit zunehmender Fermentdosis zunehmende Schädigungen an Stengel und Blättern auf (Abb. 2, II). Und zwar sind die von Auge feststellbaren Symptome der Vergiftung von der Phytolysinwirkung sehr verschieden:

In den Blättern erscheinen großflächige graubraune Nekrosen und die Nerven samt dem anliegenden Blattgewebe erscheinen braun nekrotisiert;

im Stengel ist neben einer geringen Mazeration, (die auch in der Kontrolle auftritt) eine ausgeprägte Rillenbildung, Schrumpfung und Verbräunung bis in den obersten Stengelteil zu beobachten.

Aus dem Kurvenverlauf der Abbildung 2 geht hervor, daß diese andersartigen Symptome um so stärker auftreten, je höher die vorangehende Phytolysindosis bemessen war.

Wenn in derselben Versuchsanordnung an Stelle von Phytolysin Pektinase N. B. C. als erste Dosis verabreicht wird, bleibt die Schadwirkung von Plowrightin aus. Also wird erst durch die Wirkung von Phytolysin ein Eingriff des Toxins in die Stoffwechselvorgänge der Pflanze ermöglicht.

Dieser Effekt ist mit demjenigen des oberflächenaktiven Polymyxins zu vergleichen, das in Bakterienmembranen mittels elektrostatischen Bindungen an ionisierte Phosphatgruppen eingelagert wird, dadurch die Permeabilitätseigenschaften der Membran verändert und so anderen Stoffen den Weg ins Zellinnere öffnet.

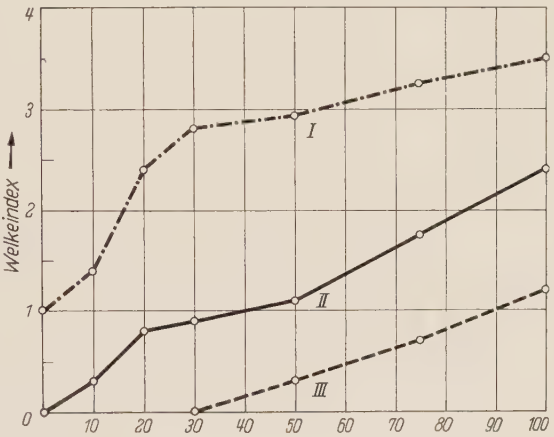



Abb. 2. Die phytotoxische Wirkung von Plowrightin und Fusarinsäure nach vorangehender Applikation unterschwelliger Dosen von Phytolysin. Abszisse: mg Phytolysin je Kilogramm Tomatenfrischgewicht. Ordinate: Welkeindex für Tomaten. I = Phytolysin + Fusarinsäure, II = Phytolysin + Plowrightin, III = Phytolysin allein

Die Krankheitssymptome an befallenen *Ribes*-Pflanzen werden durch die Kombination von Enzym und Toxin erklärt; denn an erkrankten Zweigen ist kein Gewebezerfall sichtbar, sondern die Blätter zeigen nekrotische Schädigungen und die Zweige schrumpfen unter Verbräunung ein. Ferner ist aus der Untersuchung anderer Stämme von *Dothidea ribesia* verständlich, daß in der Natur nicht jeder Befall zur Erkrankung führen muß: Einer der Versuchsstämme produziert kein Phytolysin, was neben dem Einfluß der Umweltstemperatur (die Phytolysinbildung zeigt bei 21 °C ein ausgeprägtes Optimum) ausschlaggebend für die Pathogenese sein dürfte.

Wird in einem entsprechenden Versuch an Stelle von Plowrightin Fusarinsäure, ein von verschiedenen Fusarien in vitro und in vivo synthetisiertes Welketoxin (GÄUMANN 1957) als zweite Dosis nach Phytolysin appliziert, erfolgt auch bei diesem Toxin eine wesentliche Verstärkung der Phytotoxizität. Eine Dosis von 150 mg/kg Fusarinsäure bewirkt an Tomaten in diesem Versuch den Welkeindex von 1,0. Nach vorangehender Phytolysinwirkung löst die gleiche Fusarinsäuremenge mit steigenden Fermentdosen zunehmend verstärkte Welkeschäden aus; der Welkeindex (Abb. 2, I) steigt von 1 bis 3,5. Die durch geringste Phytolysinmengen angegriffenen pflanzlichen Gewebe werden demnach auch für ein Toxin ganz anderer Herkunft empfindlicher; das Ausmaß der manifesten Schädigung steigt im Modellversuch auf mehr als das Dreifache.

In einer Zusammenstellung über Pektinenzyme und ihre Rolle in der Pathogenese nimmt WOOD (1959) an, daß diese Enzyme durch ihre mazerierende Wirkung die Wanderung von Toxinen und anderen Stoffwechselprodukten des Parasiten durch Gewebe und Zellwand erleichtern. So werden pflanzliche Zellen, die mit Pektinenzymen behandelt wurden, empfindlicher für die Wirkung anderer Substanzen wie z. B. Quecksilberchlorid (FUSHTEY 1957). Diese Forderung wird in unserem Tomatentest von Pektinase N.B.C. zwar nicht erfüllt, doch trifft sie für Phytolysin zu: dieses Enzym wird vom Pilz in reichlichem Ausmaß produziert (etwa 500 mg je Liter Kulturlösung), es schädigt in geringen Konzentrationen (50 $\gamma$/ml) das pflanzliche Plasmalemma und ermöglicht dadurch dem gleichzeitig vom Pilz synthetisierten Toxin, in die Zellen einzudringen und seine Schadwirkung auszuüben.

## Zusammenfassung

1. Aus Kulturfiltraten von *Dothidea ribesia* Fr. wurde durch fraktionierte Fällung mit Aceton ein Enzym gewonnen, das vorläufig Phytolysin genannt wird und sich durch seine mazerierende Wirkung auf pflanzliche Gewebe von Pektinenzymen unterscheidet.

2. Phytolysin wird durch pH-Werte unter 5 und über 7 irreversibel geschädigt, bei Temperaturen von 50 °C sofort, bei 30 °C langsam zerstört, und besitzt einen noch nicht definierten Co-Faktor, der sich durch Dialyse abtrennen läßt.

3. Durch Zusatz von Komplexon III, wie auch durch Ag, Pb und Al wird das Enzym gehemmt, durch Ca und Co aktiviert.

4. Die bisher aktivsten Phytolysinpräparate mazerieren pflanzliche Gewebe in Konzentrationen von 10 bis 100 $\gamma$/ml; sie beeinträchtigen ferner die Beweglichkeit von Paramaecien und Grünalgen, zeigen jedoch in den verwendeten Konzentrationen keine sichtbare Wirkung auf Amöben, Pilze und Bakterien.

5. Das Ferment wirkt nicht auf die Zellwand, sondern auf die Plasmamembran, indem es die Plasmolyse bei *Spirogyra* aufhebt.

6. Neben Phytolysin wurde aus den gleichen Kulturfiltraten ein Antibioticum, Plowrightin, isoliert, das noch nicht in reiner Form vorliegt. Die Rohextrakte besitzen keine Phytotoxizität; sie vermögen erst nach vorhergehender Einwirkung von Phytolysin Tomatensprosse zu schädigen.

## Summary

1. The culture filtrate of *Dothidea ribesia* Fr. contains an enzyme, Phytolysine, which has the ability to macerate plant tissue. Phytolysine may be partially purified by fractional precipitation with acetone. This enzyme is easily distinguished from pectic enzymes.

2. Phytolysine is irreversibly denatured at pH values below 5 and above 7. It is immediately destroyed at 50 °C and slowly loses activity at 30 °C. Phytolysine requires a dialyzable, but as yet uncharacterized, cofactor.

3. Phytolysine is inhibited by ethylendiaminetetraacetic acid as well as by Ag, Pb and Al. It may be activated by Ca and Co.

4. Plant tissue is macerated by 10 to 100 $\gamma$/ml of the impure enzyme. Similar concentrations impair the mobility of *Paramaecia* and green algae, yet the enzyme has no observable effect on *Amoeba* and representative fungi and bacteria.

5. The enzyme attacks not the cell wall, but rather the cell membrane as evidenced by plasmolytic experiments with *Spirogyra*.

6. The culture filtrates from *Dothidea ribesia* Fr. also contain an antibiotic, Plowrightin. Plowrightin is extracted from the filtrate with ethylacetate. The crude extract possesses no phytotoxicity itself, but Phytolysine enhances the destruction of tomato shoots by Plowrightin.

## Literaturverzeichnis


Ammon, R., und W. Dirscherl, 1959: Fermente, Hormone und Vitamine. Bd. I, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 564 S.

Bachmann, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **27**, 255—288.

de Bary, A., 1886: Über einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten. Bot. Ztg. **44**, 414 ff.

Cole, M., 1958: A comparative study of the rots of apples caused by different fungi. Ph. D. Thesis, University of London, England.

Deuel, H., and E. Stutz, 1958: Pectic substances and pectic enzymes. Adv. Enzym. **20**, 341—381.

Dixon, M., and E. C. Webb, 1960: Enzymes. Longmans, London, 782 S.

Fushtey, S. G., 1957: Studies on the physiology of parasitism. XXIV. Further experiments on the killing of plant cells by fungal and bacterial extracts. Ann. Botany **21**, 273—286.

Gäumann, E., 1957: Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology **47**, 342—357.

— —, St. Naef-Roth und H. Kern, 1960: Zur phytotoxischen Wirksamkeit der Enniatine. Phytopath. Z. **40**, 45—51.

Gothoskar, S. S., R. P. Scheffer, J. C. Walker and M. A. Stahmann, 1953: The role of pectic enzymes in *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 535—536.

Heitefuss, R., M. A. Stahmann and J. C. Walker, 1960: Production of pectolytic enzymes and fusaric acid by *Fusarium oxysporum* f. *conglutinans* in relation to cabbage yellows. Phytopathology **50**, 367—370.

Husain, A., and A. E. Dimond, 1960: Role of cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Phytopathology **50**, 329—331.

Kaji, A., 1956: Studies of macerating enzyme acting on middle lamella pectin. Part. I: Separation of the macerating enzyme produced by *Clostridium felsineum* var. *sikokianum*. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **20**, 8—12.

— —, 1959: Studies of macerating enzyme acting on middle lamella Pectin. Part. IV: Action of macerating enzyme on pectic substances. l. c. **23**, 131—136.

Kaji, A., and Y. Anabuki, 1958: Studies of macerating enzyme acting on middle lamella pectin. Techn. Bull. of Kagawa Agr. Coll. **9**, 141.

Laksminarayanan, K., 1957: In vivo detection of pectinmethylesterase in the *Fusarium* wilt of cotton. Naturwiss. **44**, 93.

Loeffler, W., 1957: Untersuchungen über die Ascomyceten-Gattung *Dothidea* Fr. Phytopath. Z. **30**, 349—386.

McClendon, J. H., and G. F. Somers, 1960: The enzymatic maceration of plant tissues: observations using a new method of measurement. Am. J. Bot. **47**, 1—7.

Murant, A. F., and K. S. Wood, 1957: Factors affecting the pathogenicity of bacteria to potato tubers. Ann. Appl. Biol. **45**, 635—649; 650—663.

Pierson, C. F., S. S. Gothoskar, J. C. Walker and M. A. Stahmann, 1955: Histological studies on the role of pectic enzymes in the development of *Fusarium* wilt symptoms in tomato. Phytopathology **45**, 524—527.

Scheffer, R. P., and J. C. Walker, 1953: The physiology of *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 116—125.

Tomcsik, J., und S. Guex-Holzer, 1952: Änderung der Struktur der Bakterienzelle im Verlauf der Lysozym-Einwirkung. Schweiz. Z. Path. **15**, 517.

Tribe, H. T., 1955: Studies in the physiology of parasitism. XIX: On the killing of plant cells by enzymes from *Botrytis cinerea* and *Bacterium aroideae*. Ann. Bot. N. S. **19**, 351—368.

Trione, E. J., 1960: Extracellular enzyme and toxin production by *Fusarium oxysporum* f. *lini*. Phytopathology **50**, 480—481.

Waggoner, P. E., and A. E. Dimond, 1955: Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Phytopathology **45**, 79—87.

Weibull, C., B. Zacharias and H. Beckmann, 1959: Affinity of lysozyme to structural elements of the bacterial cell as studied with enzyme labelled with radioactive iodine. Nature **184**, 1744—1745.

Wood, R. K. S., and S. C. Gupta, 1958: Studies in the physiology of parasitism. XXV: Some properties of the pectic enzymes secreted by *Pythium debaryanum*. Ann. Bot. N. S. **22**, 309—319.

— —, 1959: Pathogen factors in the physiology of disease: Pectic enzymes. In Holton, C. S., et al. Eds. Plant Pathology: Problems and progress 1908—1958. Univ. of Wisconsin Press, Madison, p. 100—109.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik*
*der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich*
*Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann*

# Physiologische und systematische Untersuchungen in der Gattung *Leucostoma*[1])

Von

H. Kern

*Mit einer Abbildung*

Inhalt: Einleitung. — 1. Kapitel. Die Wirkung von Rindenmehl und Rindenextrakten auf das Wachstum. — 2. Kapitel. Physiologische Eigenschaften der von *Sorbus*-Arten isolierten *Leucostoma*-Stämme. — 3. Kapitel. Systematische Betrachtungen. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

## EINLEITUNG

Die Schwierigkeiten der Artumgrenzung innerhalb der Ascomycetengattungen *Valsa* und *Leucostoma* (Gilman, Tiffany und Lewis 1957, Urban 1958) wurden in verschiedenen früheren Arbeiten dargelegt (z. B. Kern 1957, Hubbes 1960). Die bisher verwendeten morphologischen und physiologischen Merkmale gestatten wohl die Unterscheidung zahlreicher Stämme, aber keine scharfe Trennung der vielen in der Literatur beschriebenen Arten. Durch den Verzicht auf diese herkömmlichen Arten und die Rückkehr zu weit gefaßten Sammelarten würden jedoch die biologischen Eigenschaften dieser Pilze nicht in befriedigender Weise erfaßt; auf Grund der Beobachtungen in der Natur besteht zweifellos eine deutliche Spezialisierung, die sich zunächst im häufigeren oder ausschließlichen Vorkommen einzelner „Arten" oder Stammesgruppen auf bestimmten Wirtspflanzen äußert. Wir möchten in der vorliegenden Arbeit diesen Beziehungen nachgehen.

Viele der untersuchten Stämme sind nur schwache Parasiten oder Saprophyten; die Wirtsspektren lassen sich deshalb nicht generell in Infektionsversuchen an lebenden Pflanzen abgrenzen. Aussichtsreicher erscheinen Versuche mit abgeschnittenen und zur Erhöhung der Anfälligkeit teilweise aus-

1) Die vorliegende Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung ermöglicht; den zuständigen Behörden sei auch hier der beste Dank ausgesprochen.

getrockneten Zweigstücken (z. B. BUTIN 1955). Die zur Infektion und vor allem zur Bildung der Hauptfruchtform notwendigen Bedingungen in den Zweigstücken und in der Umwelt sind jedoch in manchen Pflanzenarten schwer zu verwirklichen und müssen genauer geklärt werden, um zuverlässige Reihenversuche zu ermöglichen. Wir untersuchten deshalb zunächst den Einfluß der Rinde und ihrer Inhaltsstoffe auf das Wachstum der Pilze in vitro.

In Versuchen von PERSSON (1955) wuchsen zwei Stämme von *Leucostoma nivea* auf Rindenmehlagar von *Populus tremuloides* und *Populus tremula* × *tremuloides* wesentlich besser als auf demjenigen von *Populus tremula*. Die eigenen Versuche zeigten auch bei anderen *Leucostoma*- und *Valsa*-Stämmen derartige Unterschiede; im ersten Kapitel sollen zunächst die Methoden beschrieben und an einigen Beispielen erläutert werden.

## 1. KAPITEL

## DIE WIRKUNG VON RINDENMEHL UND RINDENEXTRAKTEN AUF DAS WACHSTUM

### 1. Die Herstellung des Rindenmehls

Wir verwendeten die leicht vom Holz trennbare sekundäre Rinde von 1,5 bis 2 cm dicken Zweigen verschiedener Bäume und Sträucher (im folgenden als Rinde bezeichnet); eine genauere Differenzierung der Gewebe (JUNG 1959) nahmen wir zunächst nicht vor. Am günstigsten erwies sich die Zerkleinerung der Rinde unter Zugabe von Trockeneis (MANIGAULT und STOLL 1958) in einem Mixer der Marke „Turmix" zu einem feinen Mehl, das direkt zu Agarsubstraten verarbeitet oder aber mit Wasser oder organischen Lösungsmitteln extrahiert werden kann.

Um Platten gleichmäßiger Konsistenz zu erhalten, verwendeten wir im allgemeinen eine Rindenmehlmenge, die einer Konzentration von 2,5 % der Trockensubstanz des Rindenmehls entsprach; bei einem Wassergehalt von 50 % des Frischgewichtes benötigten wir somit 5 g frischen Rindenmehls (oder eine entsprechende Extraktmenge) für 100 ml Substrat.

### 2. Das Wachstum auf Rindenmehl

In einer ersten Versuchsanordnung schwemmten wir das Rindenmehl in der beschriebenen Konzentration in destilliertem Wasser auf, sterilisierten die Mischung unter Zugabe von 2 % Agar im Autoklaven und gossen je 20 cc in sterile Petrischalen von 9 cm Durchmesser. Analoge Versuche, in denen das Rindenmehl mit Propylenoxyd oder Formaldehyd desinfiziert wurde, führten zu gleichen Ergebnissen. Das hier verwendete Substrat bestand somit nur aus dem in Wasser aufgeschwemmten und mit Agar verfestigen Rindenmehl.

Wir beimpften die Platten in der Mitte mit einem Impfstück von 5 mm Durchmesser, das mit einem Korkbohrer aus der Randzone von gleichmäßig bewachsenen Malzagarplatten (2 % Malzextrakt, 2 % Agar) ausgestochen

worden war. Die Verwendung von verschieden altem und verschieden dicht gewachsenem Impfmaterial beeinflußte die Ergebnisse nur unwesentlich. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 24 °C; gemessen wurde der Durchmesser der bewachsenen Zone.

Ein Versuchsbeispiel ist in Tabelle 1 dargestellt. Wir verwendeten vier *Leucostoma*-Stämme, die von *Populus*- und *Sorbus*-Arten isoliert worden waren. Die Stämme sind vorläufig lediglich mit Herkunft und Nummer bezeichnet; auf die systematischen Zusammenhänge soll später eingegangen werden.

*Tabelle 1*

Wachstum einiger *Leucostoma*-Stämme auf Rindenmehlplatten nach drei, vier und sechs Tagen

Durchmesser der bewachsenen Zonen in Millimeter (5 mm = Durchmesser des Impfstücks, also kein Wachstum). Mittelwerte aus je vier Platten

| Stamm | Isoliert von | Wachstum auf | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Wasseragar | | | Rindenmehl von | | | | | |
| | | Tage | | | *Populus alba* Tage | | | *Sorbus aucuparia* Tage | | |
| | | 3 | 4 | 6 | 3 | 4 | 6 | 3 | 4 | 6 |
| 663 | *Populus tremuloides* Michx.; Wilderness Park, Mich., USA | 8 | 11 | 17 | 46 | 48 | 90 | 27 | 36 | 56 |
| 787 | *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.; Mykinge, Schweden | 7 | 8 | 13 | 45 | 58 | 84 | 33 | 48 | 79 |
| 739 | *Sorbus aucuparia* L.; Nante, TI, Schweiz | 6 | 6 | 7 | 5 | 14 | 37 | 38 | 48 | 70 |
| 792 | *Sorbus hybrida* L.; Stockholm | 9 | 12 | 16 | 5 | 5 | 5 | 13 | 19 | 37 |

Tabelle 1 zeigt zunächst, daß zwischen den einzelnen Kombinationen von Wirtspflanze und Pilz starke Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit bestehen. Die Streuungen innerhalb eines Versuchs waren gering, und die Versuche ließen sich ohne Schwierigkeiten wiederholen.

Wir können ferner festhalten, daß die Pilze jeweils auf denjenigen Platten am besten wachsen, welche das Rindenmehl ihrer ursprünglichen Wirtspflanze oder einer anderen Art aus derselben Gattung enthalten. Der nordamerikanische Stamm 663 wächst auf dem Rindenmehl von *Populus alba* L. schweizerischer Herkunft ebenso gut wie der schwedische Stamm 787; dasselbe gilt für zahlreiche weitere, in der Tabelle nicht aufgeführte Stämme, die in Mitteleuropa, Skandinavien und Nordamerika von verschiedenen Pappelarten isoliert wurden. — Die Stämme der Tabelle 1 wachsen — mit Ausnahme von Stamm 792 auf *Populus alba* — auch auf den Platten „fremder" Wirtspflanzen, jedoch mit mehr oder weniger verminderter Intensität.

Ähnliche Beziehungen bestehen bei vielen anderen *Valsa*- und *Leucostoma*-Stämmen. Ein von *Fagus silvatica* L. isolierter Stamm von *Valsa ambiens* (Pers.) Fr. wuchs beispiels-

weise auf Rindenmehlplatten von *Fagus silvatica* sehr viel besser als auf solchen von *Populus alba* oder *Sorbus aucuparia*. Die differenzierende Wirkung des Rindenmehls verschiedener Wirtspflanzen ist sehr unterschiedlich; weitere Ergebnisse sollen in einem späteren Kapitel geschildert werden.

Was in der Tabelle nicht zum Ausdruck kommt, sind die Unterschiede in der Dichte der Myzeldecke, die beträchtlich sein können und häufig, aber nicht immer, mit der linearen Wachstumsgeschwindigkeit parallel gehen. Um homogene Substrate zu erhalten und auch die Myzelgewichte bestimmen zu können, arbeiteten wir im folgenden mit Rindenextrakten.

### 3. Das Wachstum auf wäßrigen Rindenextrakten

Wir extrahierten das Rindenmehl mit destilliertem Wasser bei 4 °C während 6 Tagen unter zweimaligem Wasserwechsel und verwendeten den Extrakt in einer Konzentration, die 2,5 % trockenem Rindenmehl entsprach. Zur Aufbewahrung wurden die Extrakte eingefroren.

In Tabelle 2 ist zunächst ein Versuch auf festen Substraten (analog zu Tab. 1) dargestellt. Einem Teil der Platten fügten wir zusätzliche Nährstoffe zu; die verwendete KHG-Nährlösung enthält in der normalen Konzentration (1/1) 1 g Calciumnitrat, 0,25 g Magnesiumsulfat, 0,25 g Monokaliumphosphat, 0,25 g Kaliumchlorid, 0,01 g Ferrichlorid, 5 g Hefenextrakt (Difco) und 20 g Glukose im Liter.

Der Unterschied in der wachstumsfördernden Wirkung der beiden Rindenextrakte auf den Stamm 663 ist in Tabelle 2 geringer als in Tabelle 1, wo das Rindenmehl von *Populus alba* deutlich stärker stimulierte; auf Was-

*Tabelle 2*

Das Wachstum der Stämme 663 (isoliert von *Populus tremuloides*) und 792 (isoliert von *Sorbus hybrida*) auf Rindenextraktplatten

Durchmesser der bewachsenen Zonen in Millimeter (5 mm = Durchmesser des Impfstücks, also kein Wachstum). Mittelwerte aus vier Platten

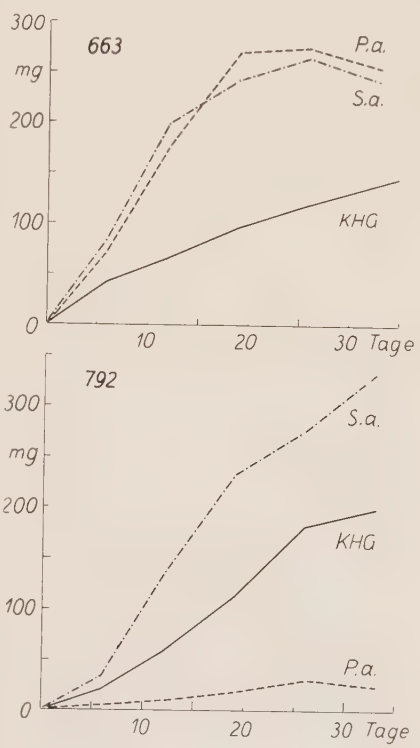
| Stamm | Ohne Rindenextrakt | | | Mit Rindenextrakt von | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tage | | | *Populus alba* Tage | | | *Sorbus aucuparia* Tage | | |
| | 3 | 4 | 6 | 3 | 4 | 6 | 3 | 4 | 6 |
| Wasseragar | | | | | | | | | |
| 663 | 6 | 9 | 15 | 7 | 19 | 48 | 5 | 14 | 44 |
| 792 | 10 | 14 | 17 | 5 | 5 | 5 | 17 | 25 | 47 |
| KHG 1/10 | | | | | | | | | |
| 663 | 24 | 35 | 61 | 21 | 35 | 65 | 40 | 54 | 85 |
| 792 | 17 | 32 | 37 | 5 | 5 | 11 | 19 | 31 | 52 |
| KHG 1/1 | | | | | | | | | |
| 663 | 35 | 50 | 85 | 34 | 51 | 83 | 51 | 68 | 90 |
| 792 | 15 | 22 | 38 | 5 | 7 | 14 | 14 | 18 | 42 |

seragar wächst dieser Stamm mit Rindenextrakt von *Sorbus aucuparia* etwas langsamer, auf KHG 1/1 und 1/10 dagegen rascher als mit dem Extrakt von *Populus alba*. Der Stamm 792 wächst in allen Zahlengruppen der Tabelle 2 — in Übereinstimmung mit Tabelle 1 — auf dem Rindenextrakt von *Populus alba* nicht oder sehr langsam; dieser Rindenextrakt enthält offenbar einen gegen den Stamm 792, jedoch nicht gegen 663 wirksamen Hemmstoff.

In einer letzten Versuchsreihe kultivierten wir die beiden Stämme in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit je 20 ml Nährlösung und bestimmten die Myzeltrockengewichte nach der bei Stoll (1954) beschriebenen Methode. Ein Versuch auf KHG 1/1 ist in der Abbildung wiedergegeben.

Auf der normal konzentrierten KHG-Nährlösung wachsen beide Stämme erwartungsgemäß gut; die Myzelgewichte nehmen bis zum Versuchsabschluß am 33. Tage ziemlich gleichmäßig zu. Das Wachstum des Stammes 663 wird durch beide Rindenextrakte stark und gleichmäßig gefördert; das Maximum wird früher erreicht als in der Kontrolle, und nach dem 26. Tage gehen die Myzelgewichte leicht zurück. Der Stamm 792 wird durch den Extrakt von *Sorbus aucuparia* stark gefördert, durch denjenigen von *Populus alba* dagegen stark gehemmt.

Diese Hemmwirkung des Pappelrindenextraktes auf den Stamm 792 konnte in Versuchen mit anderer Grundlösung (entsprechend Tab. 2) sowie in Versuchen mit nicht autoklavierten, sondern steril filtrierten Rindenextrakten bestätigt werden. Die Hemmung war nicht immer gleich stark und äußerte sich in einzelnen Fällen vor allem in einer starken Verzögerung des Wachstums, so daß das Myzelgewicht (im Unterschied zur Abb.) nach genügend langer Inkubationszeit doch noch deutlich anstieg; weitere Versuche über die Natur der Hemmwirkung sollen durchgeführt werden, sobald gereinigte Hemmstoffe aus der Pappelrinde zur Verfügung stehen. — Die fördernde Wirkung auf den Stamm 663 war zum Teil bei beiden Stämmen praktisch gleich, zum Teil beim Pappelrindenextrakt etwas besser; ein grundsätzlicher Unterschied in der Wirkung trat nicht zutage.




Das Wachstum der Stämme 663 und 792 auf KHG-Nährlösung 1/1 allein und mit Rindenextrakt von *Populus alba* (*P. a.*) und *Sorbus aucuparia* (*S. a.*). Abszisse: Alter der Kulturen in Tagen; Ordinate: Myzeltrockengewicht je Kolben in mg

Die Versuche dieses Kapitels zeigen, daß Rindenextrakte verschiedener Pflanzen das Wachstum von *Leucostoma*-Stämmen in spezifischer Weise zu fördern oder zu hemmen vermögen. Ähnlich

wirkende Stoffe wurden zum Beispiel von BUTIN (1960, gegen *Dothichiza populea* Sacc. et Br.) in der Rinde verschiedener Pappelsorten nachgewiesen. Untersuchungen über die in unserem Falle wirksamen Rindenstoffe sind im Gange und sollen in einer späteren Arbeit geschildert werden; in den folgenden Kapiteln möchten wir auf das Verhalten anderer *Leucostoma*-Stämme auf verschiedenen Rindenextrakten und auf die Möglichkeiten einer systematischen Auswertung dieser Merkmale eingehen.

## 2. KAPITEL

## PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER VON *SORBUS*-ARTEN ISOLIERTEN *LEUCOSTOMA*-STÄMME

Auf *Sorbus aucuparia* (und seltener auf anderen Arten dieser Gattung) werden in der Literatur vor allem *Leucostoma Persoonii* (Nit.) v. H. und *Leucostoma Massariana* (de Not.) v. H. angegeben. Die typischen Formen der beiden Arten lassen sich morphologisch gut auseinanderhalten; in Grenzfällen ist die Einordnung schwierig (KERN 1957). Zur besseren Charakterisierung der von *Sorbus*-Arten isolierten Stämme prüften wir zunächst ihr Wachstum auf Pappelrindenextrakt.

In einer ersten Versuchsreihe verwendeten wir kleine Petrischalen von 32 mm innerem Durchmesser (GROSSER und FRIEDRICH 1947) mit je 3 ml Nährlösung, beimpften sie in der früher beschriebenen Weise und beurteilten das Wachstum nach drei Tagen. Diese Methode erlaubt die rasche Feststellung einer Hemmwirkung.

*Tabelle 3*

Das Wachstum einiger von *Sorbus*-Arten isolierter *Leucostoma*-Stämme auf KHG 1/1 mit und ohne Rindenextrakte

Durchmesser des Myzels nach drei Tagen (5 mm = Durchmesser des Impfstücks = kein Wachstum)

| Stamm | KHG | KHG + Rindenextrakt von | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Sorbus* | | *Populus* | |
| | | *aucuparia* | *Aria* | *alba* | *tremula* |
| 780 | 20 | 20 | 20 | 5 | 8 |
| 781 | 18 | 24 | 18 | 5 | 5 |
| 792 | 16 | 20 | 15 | 5 | 8 |
| 793 | 22 | 25 | 21 | 8 | 11 |
| 4043 | 26 | 29 | 27 | 7 | 5 |
| 4085 | 20 | 19 | 19 | 5 | 7 |
| 611 | 26 | 25 | 26 | 25 | 26 |
| 739 | 26 | 26 | 24 | 23 | 26 |
| 775 | 27 | 24 | 26 | 21 | 22 |

Die meisten Stämme der Tabelle 3 werden durch die Rindenextrakte von *Populus alba* und *Populus tremula* im Wachstum stark gehemmt; nur drei Stämme wachsen gleich gut wie in der Kontrolle. Das Wachstum auf den beiden *Sorbus*-Extrakten ist von demjenigen der Kontrollen nicht wesentlich verschieden; die fördernde Wirkung auf einzelne Stämme kommt in dieser Versuchsanordnung schlecht zum Ausdruck.

Die differenzierende Wirkung der Pappelrindenextrakte auf die *Sorbus*-Stämme ließ sich mit den im 1. Kapitel beschriebenen Methoden bestätigen; die Versuche sollen nicht im einzelnen dargestellt werden. Es erhebt sich nun die Frage, ob sich das Wachstum auf Pappelrindenextrakten mit den übrigen Merkmalen der einzelnen Stämme korrelieren läßt. Eine Übersicht der untersuchten Stämme, welche die gleich zu besprechenden systematischen Beziehungen vorwegnimmt, bietet folgendes Bild:

Durch Pappelrindenextrakte nicht gehemmte Stämme

1. Typus der *Leucostoma Persoonii* (Nit.) v. H.:

| | | |
|---|---|---|
| 611 | *Sorbus aucuparia* L. | Grimentz, Wallis |
| 739 | *Sorbus aucuparia* L. | Nante, Tessin |
| 775 | *Sorbus aucuparia* L. | Compatsch, Graubünden |

Durch Pappelrindenextrakte gehemmte Stämme

2. Typus der *Leucostoma Massariana* (de Not.) v. H.:

| | | |
|---|---|---|
| 779 | *Sorbus aucuparia* L. | Zernez, Graubünden |
| 780 | *Sorbus aucuparia* L. | Compatsch, Graubünden |
| 781 | *Sorbus aucuparia* L. | Bever, Graubünden |
| 4031 | *Sorbus americana* Marsh. | Anse pleureuse, Quebec, Canada |
| 4043 | *Sorbus americana* Marsh. | Percé, Quebec, Canada |
| 4085 | *Sorbus americana* Marsh. | Mt. Hunter, N. Y., USA |

3. Typus der *Leucostoma cincta* (Fr.) v. H.:

| | | |
|---|---|---|
| 792 | *Sorbus hybrida* L. | Stockholm |
| 793 | *Sorbus arranensis* Hedl. | Uppsala |
| 794 | *Sorbus Aria* Crantz | Hälsingborg |

Die durch Pappelrindenextrakte nicht gehemmten Stämme entsprechen morphologisch dem früher (KERN 1957, S. 173) beschriebenen Typus der *Leucostoma Persoonii* (Stromata unregelmäßig-eckig mit unscharfem Rand; Scheibe relativ groß, unregelmäßig, typisch weiß; Perithecienmündungen meist auf der Scheibe zerstreut, ohne zentrale Pyknidie; Ascosporenlänge meist zwischen 8 und 13 $\mu$). Diese auf verschiedenen Rosaceen vorkommende Art steht der *Leucostoma nivea* (Fr.) v. H. auf Pappeln sehr nahe (vgl. 3. Kapitel). In Reinkultur (z. B. auf Malzagar oder KHG-Agar) erscheinen die drei hier untersuchten Stämme ziemlich einheitlich; sie bilden ein dunkles, olivgrau bis fast schwarzes Myzel, das für zahlreiche Stämme des Formenkreises der *Leucostoma nivea* charakteristisch ist.

Unter den durch Pappelrindenextrakte gehemmten Stämmen bilden diejenigen von *Sorbus aucuparia* und der ihr nahestehenden *Sorbus americana* eine einheitliche Gruppe mit den typischen Merkmalen der *Leucostoma Massariana* (Stromata relativ groß und auffällig, besonders auf jün-

geren Zweigen regelmäßig rund und scharf vorspringend; Perithecienmündungen typisch rand- und kreisständig, meist eine zentrale Pyknidienmündung umgebend; Scheibe klein, rund, hellgrau-bräunlich). Die Ascosporen sind relativ groß; die Mittelwerte der selbst gesammelten Stämme und zahlreicher Herbarmaterialien lagen zwischen 10 und 20 $\mu$ für die Länge (mit dem Schwerpunkt zwischen 16 und 19 $\mu$) und zwischen 2,5 und 3,5 $\mu$ für die Breite. Die Reinkulturen auf Malzagar sind durch ein blaß-hellgraues Luftmyzel charakterisiert; daneben zeigen die einzelnen Stämme ihre spezifischen Merkmale (Stamm 780 z. B. eine intensiv rotbraune Verfärbung des Substrats).

Von den auf anderen Wirtspflanzen beschriebenen Arten steht einzig *Leucostoma cincta* (Fr.) v. H. (auf *Prunus spinosa, Prunus Armeniaca* u. a.; DÉFAGO 1935) in ihrem Fruchtkörperbau der *Leucostoma Massariana* nahe. Sie ist durch mittelgroße, deutlich pustelartig hervortretende, rundlich-eckig-langgestreckte Stromata charakterisiert; die Perithecienmündungen stehen im Kreis um eine zentrale Pyknidienmündung oder (häufig) zerstreut, ohne Pyknidie, auf der rundlich-eckig-schlitzartig verlängerten, hellgrau-bräunlichen Scheibe; die Maße der Ascosporen liegen im Bereich derjenigen von *Leucostoma Massariana.*

Wir verglichen das Verhalten der Stämme von *Leucostoma Massariana* mit einigen Stämmen der *Leucostoma cincta* von verschiedenen *Prunus*-Arten in Reinkultur und fanden dabei folgendes:

1. Die Stämme von *Leucostoma cincta* werden durch Pappelrindenextrakte ebenfalls gehemmt.

2. Die Stämme von *Leucostoma cincta* wachsen auf Rindenextrakten von *Sorbus aucuparia* gut.

3. Die Stämme beider Arten wachsen auf Rindenextrakten von *Prunus Armeniaca* und *Prunus persica* gut.

4. Auf Rindenextrakten von *Prunus avium* wachsen die Stämme beider Arten nicht oder nur schlecht.

*Leucostoma Massariana* und *Leucostoma cincta* stimmen somit in diesen physiologischen Merkmalen überein und sind zweifellos nahe verwandt. Trotzdem erscheint es möglich und gerechtfertigt, die beiden Arten auf Grund der erwähnten morphologischen Merkmale auseinanderzuhalten. Die von verschiedenen *Sorbus*-Arten isolierten Stämme 792, 793 und 794 gehören morphologisch zum Typus der *Leucostoma cincta;* diese Einordnung wird gestützt durch das auffallend wenig gefärbte, auf Malzagar blaßgelbliche Myzel dieser drei Stämme, das mit den Angaben von DÉFAGO (1935) und mit eigenen Befunden an *cincta*-Stämmen von *Prunus*-Arten übereinstimmt. In dieser letzteren Gruppe fanden sich allerdings auch stärker abweichende Formen, die noch näher untersucht werden müssen. Darüber und über weitere Versuche zur Klärung der Wirtsspektren der beiden Arten (Infektionen an verschieden behandelten Zweigstücken u. a.) soll später berichtet werden.

## 3. KAPITEL

## SYSTEMATISCHE BETRACHTUNGEN

In diesem Kapitel soll versucht werden, die Arten der Gattung *Leucostoma* auf Grund der verfügbaren morphologischen und physiologischen Merkmale gegeneinander abzugrenzen. Einige seltene Arten (z. B. *Leucostoma Aquifolii* (Nit.) Défago auf *Ilex Aquifolium* L. oder *Leucostoma duriuscula* (Otth) Déf. auf *Fagus silvatica* L.) konnten noch nicht untersucht werden und müssen vorderhand unberücksichtigt bleiben.

### 1. Die Gliederung der Gattung *Leucostoma*

Auf Grund der morphologischen Merkmale der Fruchtkörper möchten wir die Gattung zunächst in folgender Weise unterteilen:

1. Mündungsscheibe der Fruchtkörper typisch rein weiß, höchstens im Alter schmutzig-blaß werdend.

   2. Stroma unter dem Periderm dick konzeptakelartig umrandet, besonders auf jüngeren Zweigen dunkel durch das Periderm scheinend, deutlich pustelartig vorspringend; Scheibe klein, rund. Vor allem auf *Salix*-Arten. *Leucostoma translucens*

   2*. Stroma unter dem Periderm relativ dünn oder gar nicht umrandet, nicht durch das Periderm scheinend, nicht oder nur wenig vorspringend; Scheibe relativ groß, rundlich-unregelmäßig eckig-länglich. Auf verschiedenen Laubhölzern.
   Formenkreis der *Leucostoma nivea*

1*. Mündungsscheibe hellgrau-bräunlich-dunkel, oft von den Perithecienmündungen zum größten Teil verdrängt; Stroma deutlich pustelartig vorspringend.

   3. Scheibe bräunlich-graubraun, von den zahlreichen, dicht gedrängten Perithecienmündungen meist weitgehend verdrängt; Ascosporen kürzer als 10 $\mu$. Auf Koniferen.
   Formenkreis der *Leucostoma Kunzei*

   3*. Scheibe hellgrau-bräunlich, zwischen den kreisständigen oder zerstreuten Perithecienmündungen deutlich erkennbar; Ascosporen 10 bis 20 $\mu$ lang. Auf Rosaceen.
   Formenkreis der *Leucostoma cincta*

Der Formenkreis der *Leucostoma cincta* wurde im vorhergehenden Kapitel besprochen; er umfaßt neben *Leucostoma cincta* (auf *Prunus*-Arten und anderen Rosaceen) die *Leucostoma Massariana* auf *Sorbus aucuparia* und *Sorbus americana*. *Leucostoma translucens* (de Not.) v. H. mit besonders auf jungen Zweigen von Weiden (aber auch von Erlen u. a.) typischen, glänzend schwarz durch das Periderm scheinenden Stromata wird in Übereinstimmung mit Hubbes (1960) als selbständige Art aufrechterhalten. Über die auf Koniferen vorkommende *Leucostoma Kunzei* (Fr.) Défago und ihre Verwandten gedenken wir später mehr zu berichten (vgl. Waterman 1955); im folgenden sollen einige Befunde an *Leucostoma nivea* und ihren Verwandten mitgeteilt werden.

### 2. Über den Formenkreis der *Leucostoma nivea*

Wir fassen hier diejenigen Arten zusammen, die vor allem durch relativ schwach aus der Rinde hervortretende, unregelmäßig und unscharf umgrenzte

Stromata mit typisch rein weißen, höchstens im Alter etwas dunkler werdenden Mündungsscheiben und meist auf der Scheibe zerstreute Perithecienmündungen (ohne zentrale Pyknidie) charakterisiert sind (z. B. KERN 1957, Abb. 3). Neben der *Leucostoma nivea* (Fr.) v. H. auf *Populus*-Arten gehören dazu die *Leucostoma Auerswaldii* (Nit.) v. H. (auf *Rhamnus, Frangula, Salix, Fagus* und anderen Laubhölzern beschrieben), die *Leucostoma Persoonii* (Nit.) v. H. auf *Prunus*-Arten, die *Leucostoma diatrypa* (Fr.) Déf. auf *Alnus*-Arten und die *Leucostoma viburni* (Fuck.) Déf. auf *Viburnum Lantana* L. Diese und vermutlich noch weitere Arten stehen sich morphologisch nahe und werden praktisch auf Grund der Wirtspflanze auseinandergehalten. HUBBES (1960) vereinigt aus diesem Grunde *Leucostoma Auerswaldii* mit *Leucostoma nivea.*

*Leucostoma nivea* ist auf verschiedenen Pappelarten in Europa, Nordamerika u. a. weit verbreitet und häufig und spielt zum Teil als Krankheitserreger eine wirtschaftlich wichtige Rolle (z. B. auf *Populus tremula* × *tremuloides* in Schweden; PERSSON 1955). Wir sammelten sie vor allem auf *Populus tremula, Populus tremuloides, Populus tremula* × *tremuloides* und *Populus alba* in Europa und Nordamerika. Morphologisch erscheint die Art ziemlich einheitlich und — solange man sich darauf beschränkt, sie auf Pappeln zu sammeln — leicht zu erkennen. Die Ascosporen variieren von Stamm zu Stamm ziemlich stark; die häufigsten Werte für die Länge liegen zwischen 5 und 15 $\mu$ (KERN 1957). In Reinkultur zeigen die einzelnen Stämme (wie früher beschrieben) größere oder geringere Unterschiede auf. Die meisten Stämme bilden jedoch auf Malzagar oder KHG-Agar ein z. B. im Vergleich mit *Leucostoma cincta* intensiver gefärbtes, rötlichbraunes, olivbraunes oder fast schwarzes Myzel; hellgefärbte Stämme stellen deutliche Ausnahmen dar. Unter den zahlreichen Einsporisolierungen ein und desselben Stammes, die wir miteinander verglichen, traten (hier und bei anderen Arten) nur selten wesentliche Abweichungen auf.

Auf Rindenextrakten von *Prunus avium* wuchsen alle untersuchten Stämme nicht oder nur schlecht; auf Nährlösungen wurde das Wachstum durch diesen Rindenextrakt deutlich gehemmt. Extrakte von *Prunus Padus* oder *Prunus spinosa* dagegen hemmten das Wachstum nicht.

Die zahlreichen, aus Europa und Nordamerika stammenden Isolierungen von *Leucostoma Personii,* welche in die Versuche einbezogen wurden, unterscheiden sich von *Leucostoma nivea* durchwegs durch das gute Wachstum auf Rindenextrakten von *Prunus avium;* dabei wurden die meisten Stämme nicht von *Prunus avium* selbst isoliert, sondern von anderen *Prunus*-Arten, deren Rindenextrakte allgemein viel weniger differenzierend wirken. Es erscheint somit möglich, die beiden Arten gegeneinander abzugrenzen. Auf Rindenextrakten von Pappeln wuchs die *Leucostoma Persoonii* allgemein gut.

Der einzige Stamm von *Leucostoma viburni,* der bis jetzt kultiviert werden konnte, steht durch sein gutes Wachstum auf Pappelrindenextrakt, die Wachstumshemmung durch Rindenextrakt von *Prunus avium* und durch sein olivgrün-schwarzes Myzel der *Leucostoma nivea* sehr nahe; die Berech-

tigung dieser Art kann erst auf Grund weiteren Materials entschieden werden. Dasselbe gilt (auf Grund der gleichen Kriterien) für die untersuchten Stämme von *Leucostoma diatrypa* und wenigstens für einen Teil der *Leucostoma Auerswaldii*.

### 3. Schlußfolgerungen

Die geschilderten Versuche mit Rindenmehl und Rindenextrakten bestätigen zum Teil die auf Grund der Beobachtungen in der Natur zu vermutenden, relativ engen Beziehungen einzelner Arten zu bestimmten Wirtspflanzen. Sie ermöglichen eine bessere Umschreibung mancher Arten, vermögen aber die Wirtswahl und die Grenzen der Wirtsspektren nicht ausreichend zu erklären. Versuche an abgeschnittenen Zweigstücken unter genau umschriebenen Bedingungen dürften nach den bisher vorliegenden Ergebnissen weitere Anhaltspunkte für eine sinngemäße Gliederung der Gattung liefern. Wir möchten aus diesen Gründen die einzelnen Arten in der herkömmlichen, engen Umgrenzung im wesentlichen bestehen lassen und — entsprechend z. B. dem Vorgehen von GÄUMANN (1959) bei den Rostpilzen — die nahe verwandten Arten zu Formenkreisen zusammenfassen.

## Zusammenfassung

1. Das Wachstum vieler *Leucostoma*- und *Valsa*-Stämme wird durch Rindenmehl und Rindenextrakte verschiedener Wirtspflanzen in spezifischer Weise gehemmt oder gefördert.

2. Die differenzierende Wirkung einzelner Rindenextrakte (z. B. derjenigen von *Populus alba* und *Prunus avium*) läßt sich systematisch auswerten. Mit Hilfe von Pappelrindenextrakten lassen sich z. B. die auf *Sorbus aucuparia* nebeneinander vorkommenden Arten *Leucostoma Massariana* und *Leucostoma Persoonii* auseinanderhalten.

3. Innerhalb der Gattung *Leucostoma* werden die nahe verwandten Arten zu Formenkreisen zusammengefaßt; die Beziehungen innerhalb der Formenkreise und die physiologischen Grundlagen der Wirtswahl bedürfen weiterer Untersuchungen.

## Summary

1. Ground bark and bark extracts of various plants inhibit or stimulate the growth of numerous *Leucostoma* and *Valsa* strains in a specific manner. Studies on the chemical nature of the active substances are in progress.

2. The growth on certain bark extracts (e. g. those of *Populus alba* or *Prunus avium*) may be used as a taxonomic character. With the aid of poplar bark extracts, the difference between *Leucostoma Massariana* and *Leucostoma Persoonii* has been corroborated.

3. The genus *Leucostoma* is divided into species groups. Within these groups (e. g. in the *Leucostoma nivea* group) the species are often difficult to separate on a morphological and physiological basis; however, in some cases at least specific host-parasite relations exist and will be studied in detail later.

Für ihre zuverlässige Mitarbeit möchte ich auch an dieser Stelle Frau V. SCHOECHLI-FISCHER und Frl. M. WESPI herzlich danken. — Ein Teil des untersuchten Materials wurde auf einer mit Hilfe des Albert-Barth-Fonds unserer Hochschule durchgeführten Studienreise nach Nordamerika gesammelt.

## Literaturverzeichnis

BUTIN, H., 1955: Über den Einfluß des Wassergehaltes der Pappel auf ihre Resistenz gegen *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. Phytopath. Z. **24**, 245—264.

— —, 1960: Nachweis fungistatischer Stoffe in der Rinde verschiedener Pappelsorten. Naturwissenschaften **47**, 451—452.

DÉFAGO, G., 1935: De quelques Valsées v. H. parasites des arbres à noyau dépérissants. Beitr. Krypt.flora Schweiz **8**, Nr. 3, 109 S.

GÄUMANN, E., 1959: Die Rostpilze Mitteleuropas. Beitr. Krypt.flora Schweiz **12**, 1407 S.

GILMAN, J. C., L. H. TIFFANY and R. M. LEWIS, 1957: Iowa Ascomycetes II. Iowa State Coll. J. Sc. **31**, 623—647.

GROSSER, A., und W. FRIEDRICH, 1947: Eine Testmethode zur Bestimmung von Pilzhemmstoffen. Z. Naturforschung **2 b**, 425—427.

HUBBES, M., 1960: Systematische und physiologische Untersuchungen an Valsaceen auf Weiden. Phytopath. Z. **39**, 65—93.

JUNG, J., 1959: Über die Resistenz des Kambiums heimischer Laub- und Nadelhölzer gegen Bakterien und Pilze. Naturwissenschaften **46**, 657.

KERN, H., 1957: Untersuchungen über die Umgrenzung der Arten in der Ascomycetengattung *Leucostoma*. Phytopath. Z. 30, 149—180.

MANIGAULT, P., and CH. STOLL, 1958: The role of nucleic acids in crown-gall tumor induction. Experientia **14**, 409.

PERSSON, A., 1955: Kronenmykose der Hybridaspe. Phytopath. Z. **24**, 55—72.

STOLL, CH., 1954: Über Stoffwechsel und biologisch wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll., dem Erreger der Bakanaëkrankheit. Phytopath. Z. **22**, 233—274.

URBAN, Z., 1958: Revise československých zástupcu rodu *Valsa, Leucostoma* a *Valsella*. Rozpr. Českosl. Akad. Věd **68**, 12, 101 S.

WATERMAN, A. M., 1955: The relation of *Valsa kunzei* to cankers on conifers. Phytopathology **45**, 686—692.

# Besprechung

**The Biology of Weeds.** British Ecological Society Symposium Number One. Herausgegeben von J. L. HARPER. Blackwell Scientific Publ., Oxford 1960. 256 Seiten. Ganzleinen 42 s.

HARPER bringt eine Zusammenstellung der 24 Vorträge, die im April 1959 anläßlich des ersten speziell der Biologie der Unkräuter gewidmeten Symposiums in Oxford gehalten wurden. Sie haben geschichtliche, taxonomische, genetische, physiologische und ökologische Fragen der Unkrautkunde zum Gegenstand. Auf die Bekämpfung wird, dem Charakter des Symposiums entsprechend, im allgemeinen nicht näher eingegangen. Das sehr zu empfehlende Buch bringt eine Fülle des Interessanten und Anregenden. Im Folgenden können nur einige stichwortartige Hinweise auf den Inhalt der Vorträge gegeben werden.

GODWIN berichtet über die Herkunft der englischen Unkräuter. Eine ganze Reihe von Arten wurde schon für die Zeit vor der menschlichen Besiedlung nachgewiesen. BUNTING schildert, wie bei der Bewachsung neu in Kultur genommenen Geländes Arten mit „Unkrauteigenschaften", z. B. Produktion vieler kleiner Samen, starkem Regenerationsvermögen u. a. m. die Hauptrolle spielen. Beim Wettbewerb ist die Fähigkeit, Schatten zu ertragen, einer der wichtigsten Faktoren. LIETH untersucht das Verhalten von Arten in Gräserbeständen, insbesondere ihre Ortsveränderungen. WARBURG, STYLES und PETTET referieren über Arbeiten zur Taxonomie der Unkräuter, die wegen der ständigen Dezimierung der ursprünglichen Formenmannigfaltigkeit durch die Bekämpfung oft große Schwierigkeiten bereiten. PRITCHARD zeigt, daß der rapiden Ausbreitung der aus Europa stammenden Arten Zypressenwolfsmilch und Johanniskraut in anderen Erdteilen Polyploidisierung bzw. Selektion eines bestimmten auch in Europa vorkommenden, dort jedoch nicht schädlichen „Unkrauttyps" zugrunde liegen. THURSTON gibt unter besonderer Berücksichtigung von *Avena fatua* eine Zusammenstellung unserer noch recht lückenhaften Kenntnisse über die Samenruhe von Unkräutern. Gelegentliche Beobachtungen weisen darauf hin, daß sie bei einigen Arten durch Spritzungen mit Wuchsstoffherbiziden aufgehoben werden kann. SUNDERLAND berichtet über Arbeiten zur Frage der Keimungsstimulation wurzelparasitärer Angiospermen. Nicht nur von den Wurzeln der Wirtspflanzen, sondern auch von einer ganzen Anzahl nicht parasitierter Arten werden stimulierend wirkende Stoffe in großen Mengen abgesondert. WELLINGTON behandelt Probleme der Samenkontrolle und der Maßnahmen gegen die Verschleppung von Unkräutern durch das Saatgut. HITCHINGS berichtet über Versuche zur Feststellung der vorhandenen und potentiellen Unkrautpopulation in einer Grassamenzucht und HARPER über quantitative Arbeiten zur Populationsdynamik bei (einjährigen) Unkräutern. Untersuchungen dieser Art stoßen u. a. wegen der erstaunlichen Änderungsfähigkeit vieler Arten auf größte Schwierigkeiten. So brachten z. B. genetisch einander ähnliche *Papaver rhoeas*-Pflanzen auf zwei Böden unterschiedlicher Fruchtbarkeit 4 bzw. 800 000 Samen/Pflanze. BLEASDALE versucht unter Zugrundelegung der Erntegewichte ein Maß für die Konkurrenzkraft der Unkräuter zu finden. Über die ökologische Bedeutung bestimmter Stoffwechselprodukte bei höheren Pflanzen („Allelopathie") berichten die folgenden 3 Referate. MARTIN und RADEMACHER geben einen Überblick über die Hohenheimer Untersuchungen zur Frage der allelopathischen Wirkung von Wurzelsubstanzen. Sehr starke Hemmwirkungen zeigte *Polygonum persicaria* auf Flachs und Kartoffeln. Als Ursache für die auffallend schädliche Wirkung des typischen Flachsunkrautes *Camelina* konnten GRÜMMER und BEYER (Greifswald) einige Substanzen phenolischer Konfiguration, die leicht aus den lebenden Blättern ausgewaschen werden, nachweisen. Über die stark hemmende Wirkung sich zersetzender Queckenwurzeln und -rhizome berichtet WELBANK. Auch von den Rückständen anderer Unkräuter gehen zum Teil deutliche Hemmwirkungen auf Kulturpflanzen aus. Die übrigen Referate sind einzelnen tropischen und einheimischen Arten gewidmet.

Ivens schildert, wie sich in afrikanischen Weidegebieten *Acacia*-Arten mit „Unkrauteigenschaften" (z. B. rasches Wachstum, Wurzelschößlinge u. a. m.) als Folge von Beweidungsfehlern und der Einschränkung der Steppenbrände in steigendem Maße ausbreiten. Little berichtet über schädliche, zumeist eingeschleppte Holzpflanzen Neuseelands und über Versuche zu ihrer biologischen Bekämpfung. Die in letzter Zeit zu beobachtende Zunahme ist zum Teil eine Folge des rigorosen Kampfes gegen die Kaninchen. Von den Wasserunkräutern der Tropen und Subtropen breitet sich die Wasserhyazinthe, *Eichhornia crassipes*, in bedrohlicher Weise immer mehr aus. Wie Harper in der Einführung mitteilt, wurden im ehemaligen belgischen Kongo 1956/57 50 Millionen frcs ausgegeben, um den Fluß schiffbar zu erhalten. Trotzdem trieben im nächsten Jahr stündlich 150 t Wasserhyazinthen an der Stadt Leopoldville vorbei. Gay berichtet über das kürzliche Eindringen der Art in den Sudan und die rapide, vom Menschen verschuldete Ausbreitung im Nilgebiet, die u. a. auch neue hygienische Probleme aufwirft. So nehmen z. B. Erkrankungen, bei denen an *Eichhornia* lebende Schnecken als Zwischenwirte eine Rolle spielen, zu. Weeraratna berichtet über die zahlreichen ceylonischen Mistelverwandten, die in zu stark gelichteten Teakholzwäldern, in Kautschuk- und Citruskulturen schädlich sind. Zur Bekämpfung der meisten tropischen und subtropischen Unkräuter mit chemischen Mitteln liegen noch kaum gesicherte Ergebnisse vor. Chadwick referiert über Soziologie und Ökologie des als Weideunkraut lästigen Borstgrases, Lazenby über die große Anpassungs-, Regenerations- und vegetative Vermehrungsfähigkeit des auch in USA schädlichen Hundslauches, Sagar und Harper über Keimungsverhältnisse und Konkurrenzfähigkeit von *Plantago*-Arten. Zahlreiche Einzelheiten zur Biologie der Ackerdistel und des Huflattichs bringt Bakker. —

Verzeichnis der Vorträge.

In Klammern ist die Anzahl der Literaturnachweise angegeben.

Godwin, H.: The history of weeds in Britain (16).
Bunting, A. H.: Some reflections on the ecology of weeds (29).
Lieth, H.: Patterns of change within grassland communities (10).
Warburg, E. F.: Some taxonomic problems in weedy species (10).
Styles, B. T.: The taxonomy of the British knotgrasses (7).
Pettet, A.: Some problems in *Viola tricolor* L. and its allies (5).
Pritchard, T.: Race formation in weedy species with especial reference to *Euphorbia cyparissias* L. and *Hypericum perforatum* L. (3).
Thurston, J. M.: Dormancy in weed seeds (54).
Sunderland, N.: Germination of the seeds of angiospermous root parasites (20).
Wellington, P. S.: Assessment and control of the dissemination of weeds by crop seeds (17).
Hitchings, S.: The control and eradication of weeds in seed crops (5).
Harper, J. L.: Factors controlling plant numbers (16).
Bleasdale, J. K. A.: Studies on plant competition (18).
Martin, P. and B. Rademacher: Studies on the mutual influences of weeds and crops (13).
Grümmer, G. and H. Beyer: The influence exerted by species of *Camelina* on flax by means of toxic substances (4).
Welbank, P. J.: Toxin production from *Agropyron repens* (2).
Ivens, G. W.: Species of *Acacia* as weeds (17).
Little, E. C. S.: The ecology of some New Zealand woody weeds (15).
Gay, P. A.: The water hyacinth and the Sudan (3).
Weeraratna, W. G.: The ecology and biology of parasitism of the loranthaceae of Ceylon (40).
Bakker, D.: A comparative life-history study of *Cirsium arvense* (L.) Scop. and *Tussilago farfara* L., the most troublesome weeds in the newly reclaimed polders of the former Zuiderzee (18).
Lazenby, A.: Adaptability in *Allium vineale* (10).
Sagar, G. R. and J. L. Harper: Factors affecting the germination and early establishment of plantains (*Plantago lanceolata, P. media* and *P. major*) (3).
Chadwick, M. J.: *Nardus stricta*, a weed of hill grazings (13).

W. Richter, Oldenburg

*Neuauflage:*

# Krankheiten und Schädlinge im Gemüsebau

**und ihre Bekämpfung**

Von Prof. Dr. W. Kotte, Freiburg i. Br.

3., neubearbeitete Auflage.

386 Seiten mit 160 Textabbildungen und 8 Farbtafeln.

Kartoniert DM 46,—; Ganzleinen DM 50,—

Das in seinen ersten Auflagen von Wissenschaft und Praxis hervorragend beurteilte Werk erscheint nun in seiner dritten, stark erweiterten und auf den neuesten Stand gebrachten Auflage. Es werden behandelt die Schmarotzerpilze, Insekten und andere Schädlinge der Gemüsepflanzen, deren Biologie ausführlich dargestellt wird, aber auch die Viruskrankheiten, deren Bedeutung von Jahr zu Jahr wächst. Besonderer Wert wurde auf die Darstellung der „nichtinfektiösen Schädigungen" gelegt. Ausführliche Bestimmungstabellen, die jeder Gemüseart beigegeben sind, erleichtern das Erkennen der Schadensursachen. Die Anweisungen zur Verhütung von Schäden und zur Bekämpfung der Schädlinge, einschließlich der für den gemüsebaulichen Pflanzenschutz heute zur Verfügung stehenden Geräte, werden ausführlich dargestellt. 160 zum Teil erneuerte und verbesserte Abbildungen sowie 8 neu hergestellte Farbtafeln ergänzen den Text.

*Ebenfalls von Prof. Dr. KOTTE liegt vor:*

# Krankheiten und Schädlinge im Obstbau

**und ihre Bekämpfung**

3., neubearbeitete Auflage

1958. 536 Seiten mit 233 Abbildungen und 8 Farbtafeln. Ganzleinen DM 54,—

Das bekannte und bewährte Standardwerk des Pflanzenschutzes im Obstbau vermittelt jedem, der Obstbau treibt oder in ihm lehrend oder beratend tätig ist, einen maßgeblichen Überblick über die erforderlichen biologischen und technischen Kenntnisse, um die Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen im Obstbau mit Erfolg durchführen zu können. Es wurde den vielfachen Fortschritten und Erkenntnissen der letzten Jahre entsprechend umfassend neubearbeitet und damit ganz den Erfordernissen der Jetztzeit angepaßt.

„Der ‚Kotte' gilt als das beste deutschsprachige Werk auf dem Gebiet der Schädlingsbekämpfung in zusammengefaßter Form. Auch die Aufmachung und Ausstattung sind erstklassig." *Der Landwirt, Bozen*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

*Soeben erschien:*

# Champignonanbau

**im Haupt- und Nebenerwerb**

Von WILHELM HUNTE

5., neubearbeitete Auflage

152 Seiten mit 88 Abbildungen. Kartoniert DM 12,80

Der moderne und zuverlässige Leitfaden für eine ertragreiche Champignonkultur aus der Feder eines der erfahrensten deutschen Champignonzüchter. Die vorliegende Auflage behandelt in erweiterter Form das neue Anbausystem. Besonders hervorgehoben zu werden verdient die Darstellung moderner Methoden der Pasteurisierung und Kompostierung, auch ohne Verwendung von Pferdedung. Dem Kapitel Schädlinge wurde seiner Bedeutung entsprechend mehr Raum gewidmet. Viele neue Abbildungen sind zur Ergänzung des Textes hinzugekommen.

„Alte und neue Anbauverfahren, die Möglichkeiten im Nebenerwerb und als Haupterwerbsquelle werden von dem Verfasser technisch, betriebswirtschaftlich und absatztechnisch so eingehend behandelt, wie man es in der Fachliteratur kaum noch findet."

*Deutsche Landwirtschaftliche Presse*

✲

# Krankheiten und Schädlinge der Kulturpflanzen

**und ihre Bekämpfung**

Für Praxis und Studium

Von Prof. Dr. H. BRAUN und Dr. E. RIEHM

8., neubearbeitete Auflage. 1957. 376 Seiten mit 346 Abbildungen.

Kartoniert DM 27,60; Ganzleinen DM 29,80

Durch seine in rascher Folge erschienenen Neuauflagen hat dieses Werk den neuzeitlichen Erkenntnissen und Erfahrungen auf dem Gebiet des Pflanzenschutzes und den Fortschritten in den Bekämpfungsmethoden in besonderer Weise Rechnung tragen können. Für Praxis und Studium vermittelt es einen gleich wertvollen Überblick über das Gesamtgebiet der Phytomedizin.

„In bewährter Form gliedert sich das Werk in einen allgemeinen und einen speziellen Teil. Im erstgenannten wird alles Wesentliche über Pflanzenkrankheiten, ihre Erreger und die geeigneten Abwehrmaßnahmen gesagt. Der spezielle Teil enthält eine Darstellung der wichtigeren Krankheiten und Schädlinge unserer Kulturpflanzen. Der ‚Braun/Riehm' wird infolge seiner in dieser Auflage erreichten Vervollkommnung weitere Freunde aus allen interessierten Kreisen zu den bisherigen hinzugewinnen."

*Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG